UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON UV- UND RÖNTGENSTRAHLEN UND ZUR REPARATUR DER STRAHLENSCHÄDEN BEI DEM CILIATEN STYLONYCHIA MYTILUS

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Frank-Norbert Dittmann
aus Cottbus
1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523714_0031

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON UV– UND RÖNTGENSTRAHLEN UND ZUR REPARATUR DER STRAHLENSCHÄDEN BEI DEM CILIATEN STYLONYCHIA MYTILUS

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Frank-Norbert Dittmann
aus Cottbus
1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung : 7. Dezember 1978

Dekan: Prof. Dr. F. Oberwinkler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Annermann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K.G. Grell

An dieser Stelle möchte ich Prof. D. Ammermann für die Anregung zu dieser Arbeit sowie für seine Unterstützung und Herrn Dr. H.-J. Lipps für seine Hilfe bei den Elektrophoresen danken.

Prof. W. Engels danke ich für sein Verständnis, das er der Arbeit entgegen brachte.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung
2.	Material und Methoden
2.1.	Die Stämme
2.1.1.	Kultur von Stylonychia und Kernisolierung
2.1.2.	Kultur von Chlorogonium und radioaktive Markierung
2.1.3.	Kultur von Tetrahymena zur radioaktiven Markierung
2.2.	UV - Bestrahlung
2.2.1.	Dosis und Dosisleistung
2.2.2.	Empfindlichkeit von S- und G_1- Phase
2.2.3.	Bestimmung des D_{50}- Wertes
2.2.4.	Autoradiographische Methoden zur DNA - Neusynthese
2.2.5.	Messung der DNA - Einzelstrangbrüche in isolierter DNA nach Bestrahlung
2.2.6.	Quantitative Bestimmung der Dimerisierungsrate
2.2.6.1.	In vivo Dimerisierung
2.2.6.2.	In vitro Dimerisierung
2.2.6.3.	In vitro Dimerisierung mit sensibilisierter DNA
2.2.7.	Wirkung auf die DNA Replikation
2.3.	Röntgenbestrahlung
2.3.1.	Dosis und Überlebensrate
2.3.2.	LD_{50}- Wert
2.3.3.	Coffeinempfindlichkeit
2.3.4.	Autoradiographische Methoden zur Bestimmung der DNA Neusynthese
2.3.5.	Analytische Methoden zur Messung der DNA Einzelstrangbrüche
2.3.5.1.	Einzelstrangbrüche in den Makronuklei nach in vivo Bestrahlung

2.3.5.2. Einzelstrangbrüche in den Mikronuklei nach in vivo Bestrahlung
2.3.6. Agarose - Gel Methoden zur Bestimmung von DNA - Doppelstrangbrüchen
2.3.6.1. Doppelstrangbrüche nach Bestrahlung isolierter Mikro- und Makronuklei
2.3.6.2. Doppelstrangbrüche nach in vivo Bestrahlung
2.3.7. Polyacrylamid - Gel Methoden zur Bestimmung der DNA Fragmente nach in vivo Bestrahlung
2.3.8. Kinetische Methoden zur DNA Neusynthese mit Hydroxyharnstoff
2.3.9. DNA Konzentration in den Kernen nach Bestrahlung

3. Ergebnisse

3.1. UV - Bestrahlung
3.1.1. Dosis und Empfindlichkeit von S- und G_1- Phase
3.1.2. Bestimmung des D_{50}- Wertes
3.1.3. Autoradiographische Methoden zur DNA Neusynthese
3.1.4. Messung der DNA Einzelstrangbrüche
3.1.5. Quantitative Bestimmung der Dimerisierungsrate
3.1.5.1. In vivo Dimerisierung
3.1.5.2. In vitro Dimerisierung
3.1.5.3. In vitro Dimerisierung mit sensibilisierter DNA
3.1.6. Wirkung auf die DNA Replikation

3.2. Röntgenbestrahlung
3.2.1. Dosis und Überlebensrate
3.2.2. LD_{50}- Werte
3.2.3. Coffeinempfindlichkeit
3.2.4. Autoradiographische Methoden zur Bestimmung der DNA Neusynthese

3.2.5. Analytische Methoden zur Messung der DNA Einzelstrangbrüche
3.2.5.1. Einzelstrangbrüche nach in vivo Bestrahlung in den Makronuklei
3.2.5.2. Einzelstrangbrüche nach in vivo Bestrahlung in den Mikronuklei
3.2.6. Agarose - Gel Methode zur Bestimmung von DNA Doppelstrangbrüchen
3.2.6.1. Doppelstrangbrüche nach Bestrahlung isolierter Mikro- und Makronuklei
3.2.6.2. Doppelstrangbrüche nach in vivo Bestrahlung
3.2.7. Polyacrylamid - Gel Methoden zur Bestimmung der DNA Fragmente nach in vivo Bestrahlung
3.2.8. Kinetische Methoden zur DNA Neusynthese mit Hydroxyharnstoff
3.3.9. DNA Konzentrationen in den Makronuklei nach in vivo Bestrahlung

4. Diskussion
4.1, UV - Bestrahlung
4.2. Röntgenbestrahlung

5. Zusammenfassung

6. Literatur

7. Anhang

1. Einleitung.

Während Strahlenwirkung und Reparatur bei Bakterien gut bekannt sind, zeichneten sich bei Eukaryonten erst in den letzten Jahren durch Einsatz biochemischer, molekularer und physiko - chemischer Methoden Ergebnisse ab.

Dabei standen vor allem die Schädigung der DNA, deren Konsequenz für die Zelle und mögliche Reparaturmechanismen im Vordergrund des Interesses. (LEHMANN et al., 1975; KRAEMER, 1975; TOMURA, 1975; KÖRNER et al., 1976).

Viele Reparaturmechanismen wurden postuliert, davon scheinen einige allgemeingültig zu sein.

Wird DNA einer Bestrahlung mit der Wellenlänge 254 nm ausgesetzt, so entstehen als Strahlenprodukt Thymin - Dimere. (WACKER et al., 1962) SETLOW & CARRIER, 1966; BRUNK, 1973).

Diese können durch folgende Systeme repariert werden :

- Bei der Photoreaktivierung erfolgt die Reparatur direkt an der DNA, ohne daß es zu einem Austausch der geschädigten - Basen kommt.
  Photoreaktivierung ist bisher nur bei Mikroorganismen mit Ausnahme von Saccharomyces (SETLOW, 1966; JAGGER, 1970) und einigen Xeroderma pigmentosum Fibroblasten (SUTHERLAND et al., 1975) nachgewiesen.

- Die bei Eukaryonten wichtigste Reparatur ist die Excisionsreparatur (= Dunkelreparatur) (HOWARD - FLANDERS, 1973).
  Hier wird die geschädigte Base mit ihren benachbarten Nukleotiden herausgeschnitten, so daß eine Einzelstranglücke entsteht. Die Zahl der Nukleotide, die mit der geschädigten Base aus der DNA entfernt werden, scheint für jeden Organismus spezifisch zu sein (SMETS,

1966; HOWARD & FLANDERS, 1966a).

Die durch Excision entstandenen Einzelstranglücken werden durch eine Polymerase mit Nukleotiden aufgefüllt. Nach Einwirkung einer Ligase ist die Reparatur abgeschlossen. (HOWARD - - FLANDERS, 1973).

- Durch Postreplikationsreparatur. (s.u.)

Röntgenbestrahlung verursacht auf zwei Arten Schädigungen :

- Durch direkte Strahlenwirkung.
  Hier wird das Molekül vom energiereichen Quant getroffen und dadurch verändert (HUTCHINSON, 1961).
- Durch indirekte Strahlenwirkung.
  Durch Röntgenstrahlung wird das in jeder Zelle vorhandene Wasser zersetzt. Dadurch entstehen Radikale (H_{rad}, OH_{rad}) und freie Elektronen. (STREFFER, 1969).
  Diese bewirken die Schädigung anderer Moleküle (BLUMENFELD & KALMANSON, 1966).

Beide Strahlenwirkungen treten immer zusammen auf. Sie bewirken in der DNA :

- Einzelstrangbrüche (KÖRNER, 1976)
- Doppelstrangbrüche (KÖRNER, 1976)
- Basenschäden, wie Zerbrechen, Dehydroxylierung, Bruch der glykosidischen Bindung (DUBININ, 1964).

Diese Schäden können bei Eukaryonten durch folgende Arten repariert werden :

- Durch Postreplikationsreparatur (LEHMANN, 1975).
  Diese ist besonders bei den Rodentia wirksam, bei denen die Excisionsreparatur gar nicht oder nur schwach ausgebildet ist (KÖRNER, 1976).
  Die geschädigte Base wird vor der S - Phase nicht mehr repariert. Dies hat zur Folge, daß

bei der DNA - Replikation in dem Strangabschnitt, der der geschädigten Base gegenüber liegt, Stranglücken entstehen.
Diese werden erst nach vollzogener DNA - Replikation durch Nukleotide aufgefüllt. Dieser Auffüllprozess wird durch Coffein blockiert (HAUGLI, 1972).
Einzelstrangbrüche werden nach den Untersuchungen von LEHMANN (1972) nicht durch Postreplikationsreparatur repariert.

- durch Wiedervereinigung (Rejoining) von Doppelstrangbrüchen.
Dieser Reparaturvorgang ist auch für Säugetiere (KÖRNER, 1976) nachgewiesen. Über diese Art der Reparaturvorgänge ist sehr wenig bekannt (HOWARD - FLANDERS, 1973).

- durch Wiedervereinigung von Einzelstrangbrüchen.
Einzelstrangbrüche werden - wie die Basenschäden nach UV - Bestrahlung und Röntgenbestrahlung - durch Excisionsreparatur wiedervereinigt. (KÖRNER, 1976).
Coffein hat keinen Einfluß auf Excisionsreparatur (LETT & ADLER, 1978).

Die Strahlenschädigung und mögliche Reparaturmechanismen nach UV - und Röntgenbestrahlung wurden bei dem hypotrichen Ciliaten Stylonychia mytilus untersucht.

Dieser Ciliat enthält zwei Arten von Zellkernen, die Mikronuklei und einen Makronukleus.
Während der Makronukleus die vegetativen Funktionen in der Zelle steuert ist der Mikronukleus für die geschlechtliche Fortpflanzung verantwortlich.
Durch hohe Röntgendosen wurde der Mikronukleus zerstört, der Makronukleus erwies sich als außerordentlich

resistent (AMMERMANN, 1970).

In dieser Arbeit wurde daher versucht, bei Stylonychia mytilus die verschiedenen Strahlenwirkungen des Ultraviolett - Lichtes und der ionisierenden Röntgenstrahlen unter Berücksichtigung der verschiedenen Kerntypen gegenüber zu stellen.

Dabei ergab sich die Problematik, die durch Arbeiten an Bakterien bewährten Methoden für protozoologische Untersuchungen zu modifizieren.

2. Material und Methoden.

2.1. Die Stämme.

Alle Versuche wurden mit Stylonychia mytilus - Ami (Eucilіata, Spirotricha, Hypotricha) durchgeführt, außer 2.3.5.2. und 2.3.6.1..
Stylonychia mytilus - Ami entstand aus einem Mikronukleihaltigen Stamm, der durch Röntgenbestrahlung (330 kR) mikronukleuslos wurde (AMMERMANN, 1970).

Die Versuche 2.3.5.2. und 2.3.6.1. erforderten einen mikronukleushaltigen Stamm. Hier wurde Stylonychia mytilus 3´´-D verwendet.

2.1.1. Kultur von Stylonychia mytilus und Kernisolierung.

Die Aufzucht der Tiere erfolgte in PRINGSHEIM - Lösung. (0.85 mM $Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$; 0.35 mM KCl; 0.08 mM $MgSO_4 \times 7\ H_2O$; 0.11 mM $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$; mit HCl auf pH = 6.8 eingestellt.
Die Fütterung der Tiere erfolgte alle 24 h mit Chlorogonium elongatum (AMMERMANN et al, 1974).

Nur im Versuch 2.3.5.2. wurde mit Tetrahymena pyriformis gefüttert und radioaktiv markiert.

Die Kernisolierung wurde, wenn nicht anders angegeben, 24 h nach der letzten Fütterung durchgeführt. Dabei wurden die Tiere zur Isolierung der Makronuklei auf Polyamidgaze der Maschenweite 30 µm (Vereinigte Seidenwebereien, Krefeld) gegeben und in eisgekühltem Lysiermedium (0.05% Triton - X - 100; 0.25 M Saccharose; 0.01% Spermidinphosphat $\times 6\ H_2O$; pH = 6.9) geschwenkt.

Die Kerne der Tiere fallen dabei in wenigen Minuten durch die Gaze und werden bei 4°C abzentrifugiert (1000 x g; 15 min) (AMMERMANN et al, 1974).

Die Weiterverarbeitung erfolgte wie in den einzelnen Versuchen angegeben.

In den Versuchen 2.3.5.2. und 2.3.6.1. wurden die mikronukleushaltigen Stämme ebenfalls über 30/um Gaze lysiert. Das Lysiermedium enthält dann sowohl Makronuklei als auch Mikronuklei. Das Lysat wird dann sofort auf Gaze der Maschenweite 7/um gegeben und mit kaltem Lysiermedium gespült. Dabei fallen nur die Mikronuklei durch die Gaze.

Die Mikronukleusfraktion wird bei 4°C abzentrifugiert (1000 x g, 15 min). Dieser Vorgang wird wiederholt. (AMMERMANN, 1974).

2.1.2. Kultur von Chlorogonium elongatum und radioaktive Markierung.

Die Grünalge wird in einem sterilen Kulturmedium (1 g Beefextract, Difco ; 2 g Bacto - Trypton, Difco; 2 g Yeast Extract, Difco und 1 g CH_3COONa alles in 1 l PRINGSHEIM - Lösung gelöst) gehalten und einem 12 : 12 Stunden Licht / Dunkel Wechsel ausgesetzt.

Vor dem Verfüttern an Stylonychia mytilus wurden die Algen abzentrifugiert und in PRINGSHEIM - Lösung aufgenommen (AMMERMANN, 1974).

Zur radioaktiven Markierung wird Stylonychia mytilus auf 30/um Gaze angereichert und mit PRINGSHEIM - Lösung in eine Petrischale gespült. Die so angereicherten Tiere werden gefüttert und das Nährmedium mit methyl - ^3H - Thymidin (= ^3H-TdR; spez. Aktivität ca. 50 mCi/mM, Amersham) auf die für den jeweiligen Versuch notwendige Konzentration eingestellt.

Die Dauer der radioaktiven Inkubation ist in den betreffenden Versuchen angegeben.

2.1.3. Kultur von Tetrahymena pyriformis und radioaktive Markierung.

In Versuch 2.3.5.2. wurde die DNA der Mikronuklei von Stylonychia mytilus 3´´-D über den Futterorganismus Tetrahymena pyriformis markiert. Die Aufzucht von Tetrahymena erfolgte in sterilem, synthetischem Medium (ELLIOTT et al, 1954), das mit TWEEN 80 (STONE & PRESCOTT, 1964) auf 0.05% (v/v) eingestellt wurde.

Vor dem Animpfen wird das Medium mit ^{3}H-TdR auf eine Konzentration von 10 uCi/ml gebracht.
Die Kultur wird 3 Tage bei 28°C gehalten und anschließend abzentrifugiert (1 000 x g; 15 min).
Die abzentrifugierten Tiere werden dreimal in PRINGSHEIM - Lösung gewaschen.

Die radioaktiv markierten Tetrahymena werden den angereicherten hungrigen Stylonychia - Kulturen im Abstand von 12 h zugegeben. Nach 48 h wird noch einmal mit Chlorogonium gefüttert und dann die Mikronuklei wie unter 2.1.1. beschrieben isoliert.

2.2. UV - Bestrahlung

2.2.1. Dosis und Dosisleistung

Um die Schutzwirkung des Wassers gegenüber UV zu mindern oder doch zumindest konstant zu halten, wurden sämtliche Bestrahlungen der Einzeltiere in 50 ul PRINGSHEIM - Lösung durchgeführt.
Bestrahlung und Aufzucht erfolgte in Tüpfelplatten, die in einer feuchten Kammer aufbewahrt wurden.

Die Bestrahlung wurde mit einer Quecksilber Niederdruckröhre (NN 15/44; HÖHENSONNE, Hanau) durchgeführt.
Die Wellenlänge des emitierten Lichtes lag zu über 99% bei 254 nm.

Die Dosisleistung dieser Röhre betrug 20 ergs/mm^{2} x sec (im Abstand i = 50 cm).
Die Bestimmung der jeweiligen Dosisleistung erfolgte

mit einem Blak - Ray Ultraviolet Meter (Ultra - Violet Products, San Gabriel, Californien, USA).

2.2.2. Empfindlichkeit von S- und G_1- Phase.

Die Einzeltiere wurden in der S- oder G_1- Phase bestrahlt.
G_1- Tiere erhält man aus logarithmisch wachsenden Kulturen, indem man die Querteilungsstadien isoliert und die Zellen 2 bis 4 h nach Isolierung bestrahlt. (AMMERMANN, 1970).

Die Bestrahlung der Tiere, die sich in der S - Phase befanden, wurde 8 bis 10 h nach Isolierung durchgeführt. Die Tiere hatten immer genügend Chlorogonium als Nahrungsquelle. Die Temperatur wurde auf 20°C konstant gehalten.

Stylonychia wurde mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskopes laufend auf das Fehlen (= G_1) bzw. Auftreten (= S) des Replikationsbandes untersucht (AMMERMANN, 1970).

2.2.3. Bestimmung des D_{50}- Wertes.

Der D_{50}- Wert wird im Folgenden definiert als die UV - Dosis (in kergs/mm^2) bei der die Teilungsrate bestrahlter Tiere 50% der Teilungsrate unbestrahlter Tiere erreicht.

2.2.4. Autoradiographische Methoden zur Messung der DNA Neusynthese.

Logarithmisch wachsende Tiere werden in Petrischalen bestrahlt. Entfernung der Röhre von der Petrischale 1 = 30 cm, dies entspricht einer Dosisleistung von 54 ergs/mm^2.
Die Tiere wurden 0, 2, 5, 11 Minuten lang bestrahlt. Dies entspricht einer Dosis von 0; 6,5; 16,2; 35,6 kergs/mm^2 .

Sofort nach Bestrahlung wird das Nährmedium mit ^{3}H-TdR auf 100 uCi/ml eingestellt.
1 h nach Beginn der radioaktiven Inkubation wurden die Makronuklei isoliert und zweimal in PRINGSHEIM - Medium gewaschen. Die Kerne werden 2 h in Alkohol/Eisessig = 3 : 1 fixiert und auf einen mit Chromalaungelatine beschichteten Objektträger (500 mg Gelatine, 50 mg Chromalaun in 100 ml warmen A. dest gelöst) pipettiert.

Die Kerne werden nach FEULGEN gefärbt.
(70% Alkohol; 5 min; A. dest, 10 min; 5 N HCl, 30 min; Schiff´sche Reagenz, 1 h; 3 x 5 min SO_2- Wasser; 45% Essigsäure, 10 min).

Nach Ende der FEULGEN Färbung werden die Objektträger mit einem Kodak AR 10 Stripping Film überzogen.
Die Autoradiogramme werden 2 Wochen exponiert und anschließend entwickelt. (Kodak Developer).

2.2.5. Messung der DNA Einzelstrangbrüche in isolierter DNA.

Die isolierten Makronuklei werden pelletiert und in 2 ml Glycin - Puffer (auf 250 ml A. dest: 10.5 ml 1 N NaOH; 2.025 g Glycin; 2.702 g NaCl; 0.093 g Na_2- EDTA; pH = 9.6) aufgenommen.
Anschließend werden die Kerne in einem Potter homogenisiert, bis sämtliche Kerne lysiert sind. Das Lysat wird auf 0.5% SDS und 1 M $NaClO_4$ eingestellt.
Anschließend wird mit dem gleichen Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol = 24 : 1 in der Kälte ausgeschüttelt.
Nach Trennung der Phasen (3000 x g; 30 min) wird der wässrige Überstand über Nacht gegen 0.1 SSC (bei 4°C) dialysiert. (HENNIG, 1970)
Nach der Dialyse wird die DNA - Lösung mit 48 kergs/mm^2 bestrahlt.
Die DNA wird sofort nach Bestrahlung mit dem 1.6fachen Volumen Äthanol gefällt und pelletiert (3000 x g; 30 min).

Das DNA Pellet wird in Gradientenpuffer (0.9 M NaCl; 0.1 M NaOH; 10^{-3} M EDTA; pH = 12.5) aufgenommen. Davon wurden 5 OD_{260} auf den Gradienten aufgetragen. Das Absorptionsverhältnis (E_{260} : E_{280}) war immer etwa 1.8 .

Die Einzelstrangbrüche wurden durch Ultrazentrifugation im linearen alkalischen Rohrzuckergradienten (Saccharose 5% - 20%) im Gradientenpuffer gelöst) untersucht.
Die Füllung der Zentrifugenröhrchen (Nitrocellulose) erfolgte mit einem Mischgefäß für lineare Gradienten (Fa. Hölzel, Dorfen).
Die Ultrazentrifugation wurde mit einer Beckman Ultrazentrifuge L2 65 B und dem Rotor 27.1 durchgeführt. Die Laufbedingungen waren 5°C, 22 000 rpm, 22 h Laufdauer.

Nach Ende des Laufes wurden die Gradienten durch Auspumpen vom Boden her fraktioniert. Jede Fraktion wird mit 250/ul 0.1 x SSC verdünnt. Die Bestimmung der DNA Konzentration erfolgte durch Messung gegen 0.1 x SSC + 5% Saccharose bei 260 nm (Zeiss Photometer PM 6).

2.2.6. Quantitative Bestimmung der Dimerisierungsrate.

2.2.6.1. In vivo Dimerisierung.

Die Tiere wurden wie in 2.2.1. radioaktiv markiert (10/uCi/ml; 6 h; Inhalt der Petrischale 20 ml).
Nach Ablauf der 6 h wird der Inhalt der Schale halbiert und jeweils das gleiche Volumen PRINGSHEIM - Lösung mit Chlorogonium zugegeben.
Die jetzt auf 5/uCi/ml eingestellten Kulturen werden 12 - 14 h inkubiert bis mikroskopisch keine Futtertiere mehr nachzuweisen sind.
Die Tiere werden direkt in den Petrischalen (Ø = 15 cm) bestrahlt. Der Bestrahlungsabstand war 50 cm. Dies entspricht einer Dosisleistung von 20 ergs/sec x mm^2.
Die eingestrahlten Dosiswerte waren : 0; 36; 48; 72 und 84 kergs/mm^2.

Während der ganzen Versuche wurde auch das Teilungs- und Überlebensverhalten der Tiere untersucht.
Die Tiere wurden sofort und 24 h nach Bestrahlung lysiert. Die Makronuklei werden wie in 2.1.1. isoliert. Anschließend wird das Kernpellet in Lysiermedium aufgeschwemmt und in einem Reagenzglas auf Lysiermedium + 1.4 M Saccharose geschichtet.
In der anschließenden Zentrifugation (3000 x g; 20 min) sedimentieren die Makronuklei, während die Verunreinigungen (Plasmareste) in der Saccharose zurückbleiben.

Die DNA wird wie in 2.2.5. isoliert und nach der alkoholischen Fällung im Excikator getrocknet.
Die getrocknete DNA wird bei Zimmertemperatur in 100% Ameisensäure aufgenommen bis sie vollständig gelöst ist.
Die Lösung wird in spezielle fest verschließbare Röhrchen (Vacuum Reaction Tube, Pierce Chemicals) überführt.
Die Hydrolyse wird im Ölbad (180^{o}C; 45 min) durchgeführt. Diese Methode folgt im wesentlichen SETLOW & CARRIER (1966) und GOLDMANN & FRIEDBERG (1973).

Die zur Thymin-Dimer Isolierung vorgeschlagenen Methoden von WACKER et al. (1962) und WANG et al. (1967) wurden ebenfalls erprobt.

Das Hydrolysat wird direkt auf Cellulose-Dünnschichtplatten (Polygram CEL 100; 0.1 mm Schichtdicke; Macherey & Nagel) aufgetragen.
Die Auftrennung erfolgt eindimensional bei Zimmertemperatur. Als Fließmittel erwies sich das von WANG et al. (1967) vorgeschlagene Gemisch aus n-Butanol : Ameisensäure : Wasser = 80 : 12 : 30 am geeignetesten.

Das getrocknete Chromatogramm wird in einem Dünnschichtscanner (Berthold) ausgewertet, der die radioaktive Verteilung auf dem Chromatogramm ausdruckt.

Die Thymin und Thymin-Dimer Regionen werden ausgeschnitten und die radioaktiven Moleküle in 1 ml A. bidest 12 h eluiert. Die Menge an Radioaktivität pro Region wird im Szintillator bestimmt.
Außer den Fraktionen der Thymin und der Dimer - Region wird auch der Background der Chromatogramme gemessen.

Neben dieser Elutionsmethode war es auch möglich, direkt über Integralschreiber die Verteilung der Radioaktivität abzulesen.

Bestimmung des Thymin - Dimeranteils (in %) :

$$TT\ (\ \%\ ) = \frac{TT}{TT + T} \times 100$$

Der Dimeranteil ergibt sich aus der Anzahl der Zerfälle der Dimerfraktion (TT) dividiert durch die Gesamtradioaktivität (TT + T).

2.2.6.2. In vitro Dimerisierung.

Während bei in vivo Dimerisierung immer die Schwierigkeit besteht, daß man nur eine bestimmte Menge an Tieren bestrahlen kann und damit die Menge an zu untersuchender DNA nach oben begrenzt ist, kann man hier beliebige Mengen an DNA markieren, isolieren und bestrahlen.
Die Markierung erfolgte wie in den in vivo Experimenten (2.2.6.1.).
Als UV - Dosisbereiche wurden 6; 43 und 84 kergs/mm^2 gewählt.
Die Isolierung der DNA aus den Makronuklei erfolgte nach 2.2.5. Vor der Bestrahlung wurde die so gewonnene Makronukleus DNA säulenchromatographisch gereinigt. (Über Sephadex-G-50):

- Material:
  Isolierte ^3H - DNA der Makronuklei von Stylonychia.

- Säule: (Länge 25 cm, Innendurchmesser 2 cm)
- Füllen der Säule:
  (Säulenmaterial Sephadex-G-50, Puffer: 0.3 M NaCl; 0.01 M Na-Acetat; 0.5% Sarcosyl; pH = 5
- Equilibrierung mit dem 6-fachen Volumen Puffer
- Auftrag der DNA im Puffer gelöst
- Elution mit dem Puffer bis Fraktion 117
- Volumen pro Fraktion: 30 Tropfen ≙ 1.1 ml

Abb.: 11 zeigt, daß die DNA hauptsächlich in den Fraktionen 34 bis 44 gelöst ist. Aus diesen Fraktionen wird sie mit Alkohol ausgefällt und in Phosphatpuffer (pH = 7) aufgenommen.
In diesem Phosphatpuffer erfolgt auch die Bestrahlung.

2.2.6.3. Dimerisierung mit sensibilisierter DNA.

COOK (in BEERS, 1972) beschreibt eine Methode, nach der es möglich ist schon mit niedrigen UV - Dosen der Wellenlänge 313 nm alle potentiell dazu fähigen Thyminmoleküle zu dimerisieren.
Hier wurde nach einer Abwandlung von LAMOLA (1966) vorgegangen.
Die Tiere wurden mit ^{3}H - TdR markiert, die DNA isoliert und säulenchromatographisch gereinigt.
Nach der Fällung mit Alkohol wird das Präzipitat in Phosphatpuffer (pH = 7.1) + Acetophenon (10^{-2} M) aufgenommen. Nach Entgasung wird die DNA in dieser Lösung bestrahlt.

Die Bestrahlung wird mit einer UV - Q - 81 Röhre (Original Hanau) durchgeführt. Es handelt sich um eine Quecksilberdampf - Hochdruck Lampe, die ein relativ breites UV Spektrum hat. Die relative Energie der 313 nm Linie liegt bei 71%.
Die DNA - Lösung wird in einem Abstand von 10 cm 10 Minuten lang bestrahlt.
Die DNA wird direkt nach Bestrahlung mit Alkohol gefällt, in Ameisensäure hydrolysiert (2.2.6.1.) und dünn-

schichtchromatographisch mit dem Fließmittel n-Butanol/ Essigsäure/Wasser = 80 : 12 : 30 aufgetrennt.

Anschließend wurde nach dem Verfahren von SETLOW & CARRIER (1966) vorgegangen, mit dem Unterschied, daß hier Dünnschichtchromatographie verwendet wurde. SETLOW & CARRIER wandten absteigende Papierchromatographie an.
Wie in dieser Orginalarbeit (SETLOW & CARRIER, 1966) wurden die getrockneten Chromatogramme in Streifen geschnitten und die Cellulose von der Trägerschicht entfernt.
In Reagenzgläsern wird mit 1 ml A. dest die Radioaktivität aus der Cellulose eluiert.
Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wird im Szintillator bestimmt und gegen den R_f-Wert aufgetragen.
(R_f-Wert = Entfernung Startlinie-Molekül : Entfernung Startlinie-Fließmittelfront).

2.2.7. Wirkung auf die DNA - Replikation.

Stylonychia mytilus - Ami wurde 48 h nicht gefüttert. Die mikroskopische Kontrolle zeigt (Fehlen des Replikationsbandes), daß die Tiere sich überwiegend in der G_1- Phase befinden.
Die Bestrahlung erfolgte wie unter 2.2.6.1. beschrieben.
Nach Bestrahlung wird durch Zugabe von 10 ml Chlorogonium in PRINGSHEIM - Lösung + ^3H - TdR die Lösung auf 0.5 uCi/ml Endkonzentration eingestellt.
Die Tiere werden während der Inkubationszeit in 15 cm Ø Petrischalen überführt, so daß sie sich ungestört ausbreiten können.

Jeweils nach einer Inkubationszeit von 12, 90 und 180 Minuten werden die Kulturen folgendermaßen aufgearbeitet :
Die Tiere werden zweimal in PRINGSHEIM - Lösung gewaschen und abzentrifugiert. (3000 x g; 20 min; 4°C). Das Pellet wird in 5% eiskalter TCA gepottert

und abzentrifugiert (5000 x g; 20 min). Das Pellet wird auf Sample Pans (Nuclear Chicago) übertragen und mit konzentrierter Ameisensäure versetzt.
Nach Trocknung wird die Radioaktivität im Low Background Counter (Nuclear Chicago) gemessen.

2.3. Röntgenbestrahlung.

2.3.1.Dosis und Überlebensrate.

Die Röntgenbestrahlung erfolgte mit einer Müller - RT - - 100 Röhre.
Die Bestrahlungen wurden immer ohne Filter durchgeführt.
Der Bestrahlungsabstand war entweder 10 cm (Dosisleistung 11 954 R/min) oder 37 cm (Dosisleistung 1 020 R/min).
Zur Bestimmung der Überlebensrate wurde 1 Tier in einem ml PRINGSHEIM - Lösung bestrahlt.
Die eingestrahlten Dosen waren 0; 0.33 x 10^6 R; 0.8 x 10^6R; 10^6R; 1.2 x 10^6R und 1.4 x 10^6R.
Jeweils 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Bestrahlung wird die Zahl der Tiere bestimmt. Dabei wurde alle 24 h das Wasser gewechselt und die Tiere mit Futter (Chlorogonium) versorgt.
Die Überlebensrate ergibt sich aus dem Quotienten N_o (Zahl der bestrahlten Tiere) durch N (Zahl der unbestrahlten Tiere).

2.3.2.LD_{50}- Werte.

Der LD_{50}- Wert gibt an, zu welchem Zeitpunkt durch Absterben und Teilungsverzögerung nur noch halb soviele Tiere der bestrahlten Kategorie in Bezug zur unbestrahlten vorhanden sind.

Die Bestimmung dieses Zeitpunktes erfolgt zeichnerisch auf einer graphischen Darstellung , in der N_o/N (Ordinate) gegen die Stunden nach Bestrahlung (Abzisse)

aufgetragen sind. (Abb.: 16)
Dabei ergibt sich für jede eingestrahlte Dosis ein charakteristischer LD_{50}- Wert (Dimension h). (Abb.: 17).

2.3.3.Coffeinempfindlichkeit.

Nach HAUGLI (1972) und LEHMANN (1972a) bewirkt eine Zugabe von Coffein in das Medium eine Übersensibilisierung gegen Strahlen (bes. Röntgenstrahlen). Diese beruht darauf, daß die Postreplikationsreparatur blockiert wird (LETT & ADLER, 1978).
Die Excisionsreparatur ist von Coffein nicht betroffen (KÖRNER, 1976).

Die Coffeinkonzentration, bei der bei unbestrahlten Tieren keine Verminderung der Teilungsrate festzustellen ist, beträgt 0.01% (w/v).
Mit dieser Konzentration wurden die Kulturen mit einer Dosis von 10^6 R bestrahlt und die Schädigung an Hand der Teilungsrate bestimmt.

2.3.4.Autoradiographische Methoden zur Messung der DNA - Neusynthese.

Logarithmisch wachsende Tiere werden in Petrischalen bestrahlt (0.8 x 10^6 R).

Die weitere Behandlung erfolgte genau wie in dem entsprechenden UV - Versuch (2.2.4.).

2.3.5.Analytische Methoden zur Messung der DNA - Einzelstrangbrüche.

Zur Feststellung des Ausmaßes der Einzelstrangbrüche, die während der Bestrahlung entstehen, wurde die neue Methode des nichtkontinuierlichen, linearen und alkalischen Rohrzuckergradienten verwendet (ZUBROFF & SARMA, 1976).
Die Tiere wurden mit 0.8 x 10^5 R bestrahlt. Die Makro-

nuklei wurden sofort und 24 h nach Bestrahlung isoliert und pelletiert. (2.2.1.)

Die Kulturen, die zur Untersuchung der Einzelstrangbrüche in der Mikronukleus - DNA dienen, werden halbiert. Die eine Hälfte wird bestrahlt, die andere unbestrahlt aufgearbeitet.

Die pelletierten Kerne werden in einem Suspensionspuffer aufgenommen : - 0.024 M EDTA
- 0.075 M NaCl
pH = 7.4

Zur Zentrifugation werden Polyallomerröhrchen (Beckman, mit 0.5% EDTA vorbehandelt) verwendet.
Auf den Boden des Röhrchens werden mit einer Pipette 0.5 ml 2.3 M Sucrose eingefüllt. Der Gradient wird mittels eines Gradientenziehers (Gilson - Mixograd, Abimed) aufgetragen :

- 5% - 20% Saccharose
- 0.9 M NaCl
- pH = 12.5

Auf den Gradienten kommen 0.2 ml einer Lysierlösung : (0.3 M NaCl; 0.03 M EDTA; 0.1 M Tris; 0.5% SDS; pH = 12.5).

Auf diese Lösung werden 0.2 ml der Kernsuspension (im Suspensionspuffer) aufgeschichtet. Schließlich werden 0.1 ml der Lysierlösung aufgetragen.

Nach Fertigstellung des Gradienten verbleibt dieser 2 h bei Zimmertemperatur. Die Kerne werden in dieser Zeit lysiert. (optische Kontrolle).
Der Lauf wird in einer Beckman Ultrazentrifuge (L2 65 B, Rotor SW 65) durchgeführt.
Bedingungen: 20°C; 45 000 rpm; t = 210 min)

2.3.5.1.Einzelstrangbrüche nach in vivo Bestrahlung der Makronuklei.

Bestrahlt wurde der Stamm Stylonychia mytilus - Ami.

Die Fütterung und radioaktive Markierung erfolgte wie unter 2.1.2. beschrieben.

2.3.5.2.Einzelstrangbrüche nach Bestrahlung markierter Mikronuklei in vivo.

Bestrahlt wurde der Stamm Stylonychia mytilus - 3´´-D. Die Fütterung und radioaktive Markierung erfolgte über Tetrahymena pyriformis (s. 2.1.3.). Isoliert wurden nur die Mikronuklei.

In diesem Versuch wurde als Standard - DNA tritium-markierte DNA des Phagen phi-X-174 verwendet (vom Max Planck Institut für medizinische Forschung, Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

phi-X-174 DNA : einzelsträngig, 1.82×10^6 D ≙ 16 S.

2.3.6.Agarose-Gel Methoden zur Bestimmung von DNA - Doppelstrangbrüchen.

Zur Bestimmung der Doppelstrangbrüche wurde die Methode der neutralen Agarose-Gel Elektrophorese verwendet (LIPPS & MORRIS, 1977; MORRIS, 1977).

Die Aufarbeitung der DNA erfolgte wie in 2.2.5. beschrieben, nur mit dem Unterschied, daß der Glycin - Puffer mit Proteinase K (1mg/ml) versetzt war.
Die pelletierte DNA wird im Gel - Puffer aufgenommen: (0.04 M Tris; 0.02 M Na-Acetat X 3 H_2O; 0.002 M EDTA; auf pH = 7.8 eingestellt).
Dabei wurden etwa 0.5 mg/ml DNA im Gelpuffer + 0.1% SDS gelöst.
Nach Auftrag von 10 µg DNA erfolgte die Auftrennung über 1,7% Agarose - Gele.
Die Trennung dauerte etwa 16 h bei 30 V Spannung.
Die Färbung der Gele erfolgte über Ethidiumbromid (0.25 µg/ml), das im Gel - Puffer gelöst wurde.

2.3.6.1.Doppelstrangbrüche nach Bestrahlung isolierter Mikro- und Makronuklei.

Verwendet wurde zur Isolierung der Makronuklei der

Stamm Stylonychia mytilus - Ami, zur Isolierung der Mikronuklei Stylonychia mytilus - 3´´D.

Verglichen werden die DNA Größenverhältnisse bei Kernen die mit 5 x 10^5 R bestrahlt wurden und unbestrahlten Kernen. Die Kerne werden in Lysiermedium bestrahlt. Dieses wurde während der Bestrahlungszeit auf 4°C gekühlt.
Weitere Verarbeitung nach (2.3.6.).

2.3.6.2.Doppelstrangbrüche nach in vivo Bestrahlung.

Aus dem Stamm Stylonychia mytilus - Ami wurde die DNA unbestrahlter Tiere, von Tieren die mit 80 000 R bestrahlt wurden,und Tieren, die nach der 80 000 R Bestrahlung noch 24 h inkubiert wurden, isoliert.

Die DNA wurde wie in 2.3.6. weiterbehandelt.

2.3.7.Polyacrylamid-Gel Methode zur Bestimmung der DNA - Fragmente nach in vivo Bestrahlung.

Da mit der Agarose - Gel Technik nur relativ große DNA - Bruchstücke erfaßbar sind, wurde zum Nachweis kleinster DNA Fragmente die Polyacrylamid - Gel Methode nach LOENING (1968) verwendet.
Stammpuffer: (32.5 g Tris; 35.1 g Na-Dihydrogenphosphat; 278 g Titriplex III Na-Salz, Merck; in 1500 ml A. dest gelöst).
Elektrodenpuffer: (2.5 g Saccharose; 500 ml Stammpuffer; in 2000 ml gelöst).
Probenpuffer: (6 g Saccharose; in 100 ml Elektrodenpuffer gelöst).
Stammacrylamid - Lösung: (15% Acrylamis; 0.75% Bisacrylamid).
Gele (2.4%) : (5ml Stammacrylamid; 6.25 ml Stammpuffer; 19.7 ml A. dest; 15 sec entgasen; 25 µl TED; 0.25 ml Ammoniumpersulfat).

Die Tiere werden mit 80 kR bestrahlt. Die DNA der

Tiere wird isoliert (2.2.5.), und zwar :

- von unbestrahlten Tieren
- von Tieren die bestrahlt wurden
- von Tieren die nach der Bestrahlung 12 h inkubiert wurden.
- von Tieren die nach der Bestrahlung 30 h inkubiert wurden.

Die pelletierte DNA wurde in Probenpuffer aufgenommen und etwa 100 µg aufgetragen.
Als Marker wurde 5 S RNA verwendet (freundlicherweise von Herrn NOCK, Abt.f.Zellforschung zur Verfügung gestellt).

Nach der Elektrophorese (2 h; 5 mA/Gel)erfolgt das Scannen der Gele nach LOENING (1968) mit einem Joyce - Loebl Scan 400.

2.3.8.Kinetische Methoden zur Messung der DNA - Neusynthese mit Hydroxyharnstoff.

Im ersten Teil des Versuches wird untersucht, ob Röntgenbestrahlung einen Einfluß auf die DNA - Synthese hat. Kulturen von Stylonychia mytilus - Ami wurden mit einer Röntgendosis von 180 000 R bestrahlt. Sofort nach Bestrahlung wird das Nährmedium mit ^{3}H-TdR auf 5 µCi/ml eingestellt.
Die DNA der Tiere wird nach 3.5 h; 6 h; 10 h und 15 h isoliert (2.2.5.).
Die Konzentration der DNA wird durch die Diphenylaminmethode (CHANDRA & APPEL, 1973) und die Radioaktivität durch Szintillationsmessung bestimmt. Aus diesen Werten ergibt sich die spezifische Aktivität der DNA als Maß für die Intensität der DNA Neusynthese.

Anschließend wird die Hemmwirkung von Hydroxyharnstoff auf die DNA Neusynthese untersucht. Zu diesem Zweck werden die Kulturen in Anwesenheit von 1 mg/ml Hydroxyharnstoff 3 h vorinkubiert. Ein Teil dieser Kultur wird mit 180 000 R bestrahlt, der andere nicht.
Beiden Kulturen wird nach Ende der Bestrahlung ^{3}H - TdR zugegeben (Endkonzentration 5 µCi/ml).

Anschließend wird wie im obigen Teil verfahren.

2.3.9.DNA Konzentrationen in den Kernen nach in vivo Bestrahlung.

Mikronukleushaltige Stämme von Stylonychia mytilus wurden geklont. Jeweils ein Teil der Kulturen wurde mit 80 000 R bestrahlt und 21 bzw. 30 h nach Bestrahlung auf einen Chromalaungelatineobjektträger übertragen.
Nach Fixierung und Feulgenfärbung (2.2.4.) wurde der DNA - Gehalt mit einem Ultramikrospektralphotometer (UMSP I, Zeiss) (AMMERMANN, 1971) gemessen.

Für die Durchführung der Messungen danke ich Herrn cand.rer.nat. UHLIG.

3.Ergebnisse.

3.1. UV - Bestrahlung.

3.1.1.Dosis und Empfindlichkeit von S- und G_1- Phase.

Um eine genaue Dosis - Wirkungsabhängigkeit aufzustellen, wurde die Schutzwirkung des Wassers dadurch herabgesetzt, daß die Tiere nur in 50 µl Nährmedium bestrahlt wurden.

Die Tabellen 3.1.1.1.; 3.1.1.2. und 3.1.1.3. zeigen den Zusammenhang zwischen eingestrahlter UV - Dosis (in sec) und Zahl der Tiere zu bestimmten Zeitpunkten nach Bestrahlung (1. Tag p.r. = 24 h; 2. Tag p.r. = 48 h und 3. Tag p.r. = 72 h).
Außerdem wurde berücksichtigt, in welchem Zellstadium Stylonychia bestrahlt wurde (G_1- oder S - Phase).

Die Abnahme der Teilungsaktivität ist besonders in den ersten 3 Tagen bei allen Tieren erkennbar.
Bei einer UV Bestrahlung von 300 sec ($\hat{=}$ 6 kergs/mm^2)

Tab.: 3.1.1.1.

UV - Dosis (1 sec)	Zellsta-dium	1.Tag p.r.	2.Tag p.r.	3.Tag p.r.
0	G_1	4, 2, 2,	15, 8, 8,	32, 35,
0	G_1	4, 4, 4, 4	16,16, 9, 16	42, 40,
0	G_1	1, 2,	4, 8,	24, 38,
0	G_1	2, 2, 2,	8, 8, 8,	30, 35, 32,
0	G_1	n = 12	n = 12	n = 9
		$\bar{x} = N_0 = 2.75$	$N_0 = 10.333$	$N_0 = 31.222$
		s = 1.1385	s = 4.185	s = 11.819
0	S	wie G_1		
60	G_1	2, 2, 4,	8, 8, 8,	16, 22, 16,
60	G_1	2, 2,	8, 8,	16, 16,
60	G_1	4, 1,	8, 4,	32, 16,
60	G_1	2, 4,	8,16,	16, 32,
60	G_1	n = 9	n = 9	n = 9
		$\bar{x} = N_1 = 2.56$	$N_1 = 8.444$	$N_1 = 20.222$
		s = 1.1304	s = 3.127	s = 6.960
		$N_1/N_0 = 0.93$	$N_1/N_0 = 0.82$	$N_1/N_0 = 0.65$
60	S	wie G_1		

Tab.: 3.1.1,2.

... - Lesia ...)	Sellsta- -ung	1.Jar p.r.	2.Jar p.r.	3.Jar p.r.
300	G_1	1, 1, 2,	4, 4, 8,	8, 8, 16,
300	G_1	2, 1,	4, 2,	8, -,
300	G_1	2, 2,	4, 4,	16, 16,
300	G_1	2, 2,	4, 6,	16, 16.
300	G_1	n = 9	n = 9	n = 9
		$\bar{x} = N_2$=1.67	$\bar{x} = N_2$=4.44	$\bar{x} = N_2$=12.00
		s = 0.500	s = 1.667	s = 4.899
		N_2/N_0=0.606	N_2/N_0=0.430	N_2/N_0=0.384
300	S	2, 1, 1,	4, 2, 2,	16, 8, 4,
300	S	2, 1,	4, 4,	12, 16,
300	S	1, 2, 2,	4, 3, 5,	12, 12, 12,
300	S	4, 2, 1, 2,	8, 6, 2, 4,	16, 16, 8, 8,
300	S	n = 12	n = 12	n = 12
		$\bar{x} = N_3$=1.58	$\bar{x} = N_3$=3.58	$\bar{x} = N_3$=11.67
		s = 0.515	s = 1.240	s = 3.985
		N_3/N_0=0.576	N_3/N_0=0.347	N_3/N_0=0.374

Tab.: 3.1.1.3.

UV - Dosis (sec)	Zellsta-dium	1.Tag p.r.	2.Tag p.r.	3.Tag p.r.
600	G_1	1, 1, 1, 1,	2, 4, 2, 2,	2, 8, 4, 4,
600	G_1	1, 2,	1, 4,	1, 8,
600	G_1	1, 1, 1,	1, 2, 2,	2, 4, 4,
600	G_1	1, 1, 1,	1, 2, 2,	4, 4, 1,
600	G_1	n = 12 $\bar{x} = N_4 = 1.08$ $N_4/N_0 = 0.394$	n = 12 $\bar{x} = N_4 = 2.00$ $N_4/N_0 = 0.194$	n = 12 $\bar{x} = N_4 = 3.83$ $N_4/N_0 = 0.123$
600	S	1, 1, 1, 1,	2, 1, 2, *,	8, 1, 4, *,
600	S	1, 1, 1, 2,	2, 2, *, 2,	1, 1, *, 2,
600	S	1, 1, 1, 1,	*, 2, 2, 2,	*, 6, 4, 2,
600	S	1, 1, 1, 1,	1, 2, 1, *,	*, 8, 2, *,
600	S	1, 1,	*, 1,	*, *,
600	S	n = 18 $\bar{x} = N_5 = 1.06$ s = 0.236 $N_5/N_0 = 0.384$	n = 18 $\bar{x} = N_5 = 1.17$ s = 0.858 $N_5/N_0 = 0.113$	n = 18 $\bar{x} = N_5 = 2.17$ s = 2.73 $N_5/N_0 = 0.069$

erholen sich die Tiere im 3 Tage Zeitraum soweit, daß sie 72 h nach Bestrahlung die Teilungsrate unbestrahlter Tiere wieder erreichen.
Bei einer Bestrahlungsdauer von 600 sec ($\hat{=}$ 12 kergs/mm^2) zeigt sich, daß einige Tiere die während ihrer S - Phase bestrahlt wurden nach 72 h nicht mehr lebensfähig waren. Die Tiere, die in der G_1- Phase bestrahlt wurden überlebten alle diese Dosis.

Die folgende Tabelle zeigt die Teilungsverzögerung zum Zeitpunkt 48 h nach Bestrahlung (N_{G1} = Zahl der Tiere, die in der G_1- Phase bestrahlt wurden, N_S = Zahl der Tiere die in der S - Phase bestrahlt wurden, N_o = Zahl der unbestrahlten Tiere. Die Dosis ist sowohl in sec als auch in kergs/mm^2 angegeben) :

Dosis (sec)	0	60	300	600
Dosis (kergs/mm^2)	0	1.2	6	12
Verzögerung G_1 (N_{G1}/N_o)	1	0.82	0.43	0.19
Verzögerung S (N_S/N_o)	1	0.82	0.35	0.11

(s. auch Abb.: 1)

Die gefundenen Werte erfüllen zu über 95% die Bedingungen einer Exponentialfunktion $y = e^x$; und zwar:

Für S - Phase bestrahlte Tiere:

$$N/N_o = e^{-0.14\ D}$$

Für G_1- Phase bestrahlte Tiere:

$$N/N_o = e^{-0.18\ D}$$

Für unsynchron bestrahlte Tiere :

$$N/N_o = e^{-0.16\ D}$$

wobei D die eingestrahlte Dosis in kergs/mm^2 ist.

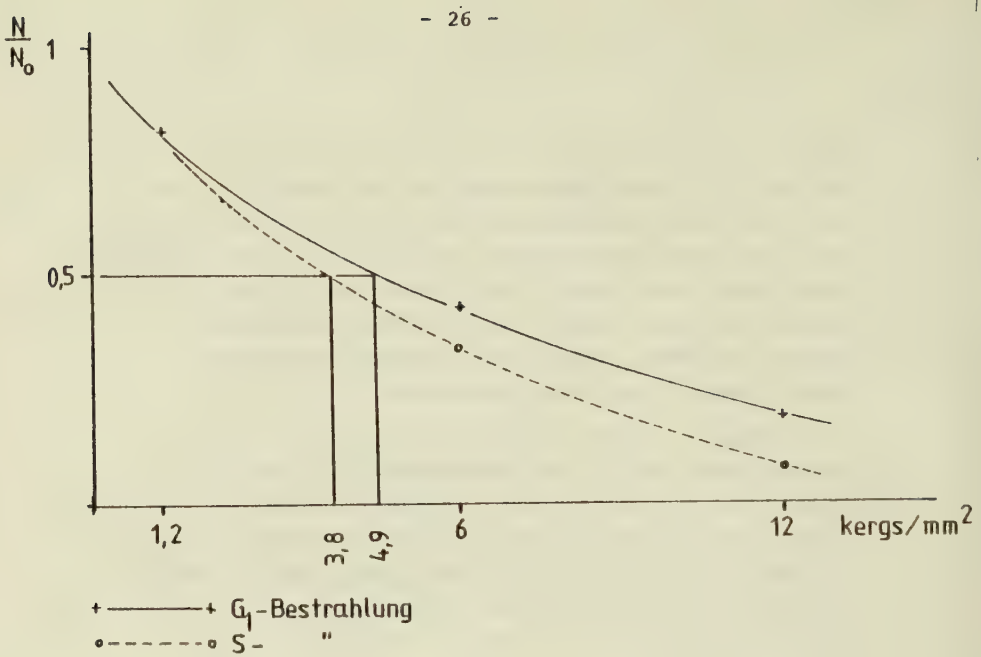


Abb.: 1 Teilungsverzögerung 48 h nach Bestrahlung.

Die Tiere wurden entweder in der G_1- oder in der S - Phase bestrahlt.
Flüssigkeitsvolumen während der Bestrahlung: 50/ul
Abzisse: eingestrahlte UV - Dosis
Ordinate: Teilungsverzögerung (s. Text)
Zeichnerische Bestimmung der Dosis, bei der die Teilungsverzögerung 50% beträgt.

3.1.2. Bestimmung der D_{50}- Werte.

Auf Grund der mathematischen Beziehungen zwischen Teilungsverzögerung und eingestrahlter Dosis, (3.1.1.), als auch durch zeichnerische Bestimmung (Abb.: 1), läßt sich der Dosiswert berechnen (HEWLETT PACKARD 97, Curve Fitting Program), bei dem 48 h nach Bestrahlung die Teilungsrate um 50% vermindert ist.

Die D_{50}- Werte sind :

- Für S- Phasen Bestrahlung : 4.9 kergs/mm^2

- Für G_1- Phasen Bestrahlung : 3.8 kergs/mm^2
- Für unsynchrone Tiere : 4.3 kergs/mm^2

Aus diesen D_{50}- Werten läßt sich grob die Empfindlichkeit der S - Phase (nur in Bezug zur Teilungsfähigkeit) abschätzen :

$$\% \text{ Empfindlichkeit} = 1 - \frac{D_{50(G)}}{D_{50(S)}} = 22\ \%$$

Demnach ist die S - Phase um ca. 20% empfindlicher als die G_1- Phase. Dies gilt aber nicht für Strahlendosen im Bereich um 1.2 kergs/mm^2. Hier sind keine Unterschiede zwischen S- und G_1- Phase feststellbar.

3.1.3. Autoradiographische Methoden zur Messung der DNA Neusynthese.

Bei Eukaryonten ist das wichtigste Reparatursystem die Excisionsreparatur oder die Dunkelreparatur. (HOWARD - FLANDERS, 1973; BÖHME & ADLER, 1970)

Hier wird die geschädigte Base mit ihren Nachbarnukleotiden herausgeschnitten. Dadurch entsteht eine Einzelstranglücke in der DNA. In diesem Versuch sollte diese Lücke mit Nukleotiden, unter anderem mit dem im Medium befindlichen ^{3}H-Thymidin aufgefüllt werden. Dadurch sollten die Reparaturbereiche in der DNA radioaktiv markiert werden. (HART & SETLOW, 1974; KRAEMER, 1975).
Die Sichtbarmachung der radioaktiven Bereiche erfolgte durch Autoradiographie.

Die Ergebnisse sind in Abb.: 2,3,4 und 5 (Anhang) dargestellt.
Im ganzen Dosisbereich war es nicht möglich einen von der normalen DNA - Replikation unabhängigen Einbau des externen ^{3}H - Thymidins nachzuweisen.

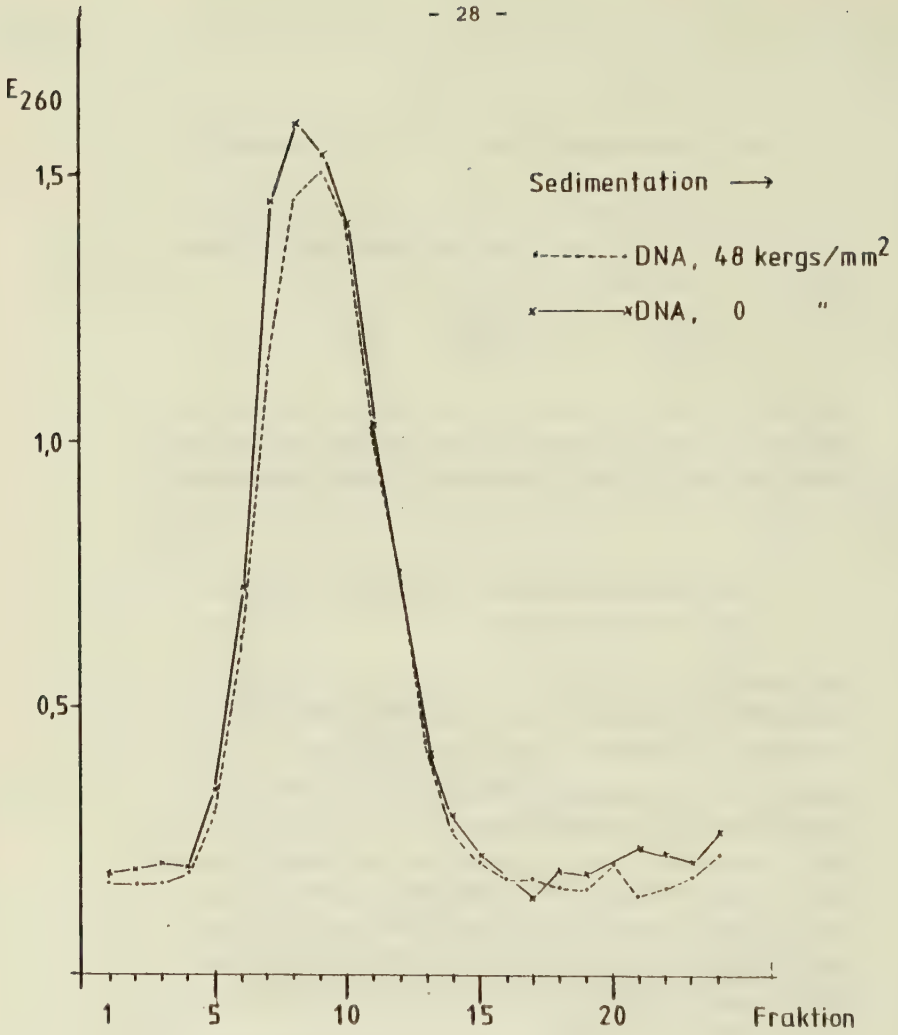


Abb.: 6 Test auf Einzelstrangbrüche.
Vergleich von unbestrahlter DNA mit
bestrahlter DNA (48 kergs/mm^2).
Alkalischer Saccharosegradient (5% - 20%).

3.1.4. Messung der Einzelstrangbrüche nach Bestrahlung isolierter DNA des Makronukleus.

Schon in der Einleitung wurde darauf hingewiesen, daß der Theorie nach durch UV - Bestrahlung nur Basenschäden zu erwarten sind. Um dies zu untermauern,

wird die Wirkung einer Dosis von 48 kergs/mm^2 auf isolierte DNA des Makronukleus, die in 0.1 SSC gelöst war, untersucht.

Abb.: 6 zeigt, daß das Sedimentationsverhalten bei der bestrahlten wie bei der unbestrahlten DNA gleich ist.
Einzelstrangbrüche wurden also nicht induziert.

Schon eine energetische Betrachtung zeigt, daß Einzelstrangbrüche kaum zu erwarten sind. So liegt die Energie, die aufgewendet werden muß um einen DNA Einzelstrang zu spalten bei 15 - 20 eV (BACQ & ALEXANDER, 1958). Die Energie der Quanten, die bei 254 nm eingestrahlt liegen beträgt 4.88 eV.

Daraus folgt, daß Einzelstrangbrüche auch bei in vivo Bestrahlung nicht vorkommen können, da hier die Energie, die aufzuwenden ist um DNA im Nukleohistonkomplex zu spalten,bei 60$\pm$ 10 eV liegt (LETT, 1970).

3.1.5. Quantitative Bestimmung der Dimerisierungsrate.

3.1.5.1. In vivo Dimerisierung.

Während der Bestrahlung befanden sich die Tiere in Petrischalen mit dem Durchmesser 15 cm. Da die Tiere immer in 20 ml Nährmedium bestrahlt wurden, war die Wasserhöhe 2 mm.
Wurde die hydrolysierte DNA unbestrahlter Tiere einer Dünnschichtchromatographie unterzogen, so erhält man einen Peak (Abb.: 7). Wurden die Tiere mit UV bestrahlt und sofort deren DNA hydrolysiert, so erhielt man zwei Peaks (Abb.: 8).
Die DNA von bestrahlten Zellen, die nach Bestrahlung noch 24 h inkubiert wurden, zeigte nur einen Peak (Abb.: 9).
Auf Grund der R_f- Werte dieser Peaks ergibt sich fol-

gende Identität :

Peak	R_f-(gefunden)	R_f-(Literatur)	Molekül
1	0.30-0.31	0.29 SETLOW & CARRIER, 1966	Thymin-Dimer
2	0.59-0.61	0.60 SETLOW & CARRIER, 1966	Thymin

Die Wahl dieser Fließmittel erwies sich als vorteilhaft, da auf Grund der R_f- Werte ein großer Abstand zwischen dem Peak des Strahlenprodukts (Thymin - Dimer) und dem Peak des Thymins gewährleistet wird.

Der Vergleich zwischen den R_f- Werten ergibt, daß sie sich hier für die angewandte Dünnschichtchromatographie kaum von der in der Literatur benutzten Papierchromatographie unterscheiden.

Der R_f- Wert differiert nur zwischen Dünnschichtchromatographie und absteigender Papierchromatographie. (3.1.5.3.).

Alle Versuche das Dimer anzufärben, insbesondere die Fluoresceinmethode (WIELAND, 1951), waren erfolglos.

Für die bestrahlten Tiere, deren DNA sofort nach Bestrahlung isoliert wurde, ergibt sich nach Elution aus den Chromatogrammen und Szintillationsmessung folgende radioaktive Verteilung zwischen Dimerpeak und Thyminpeak (s. auch Abb.: 10) :

UV-Bestr. (min)	Dosis kergs/mm^2	cpm-Dimer	cpm-Thymin	TT (%)
30$^+$	36	134	2 741	5.2
30	36	312	4 710	6.2
40	48	448	4 959	8.3
40	48	375	5 632	6.2
60$^+$	72	500	6 500	7.7
70	84	318	3 646	8.7
70$^+$	84	300	3 400	8.8

($^+$ = Bestimmung durch Integralschreiber)

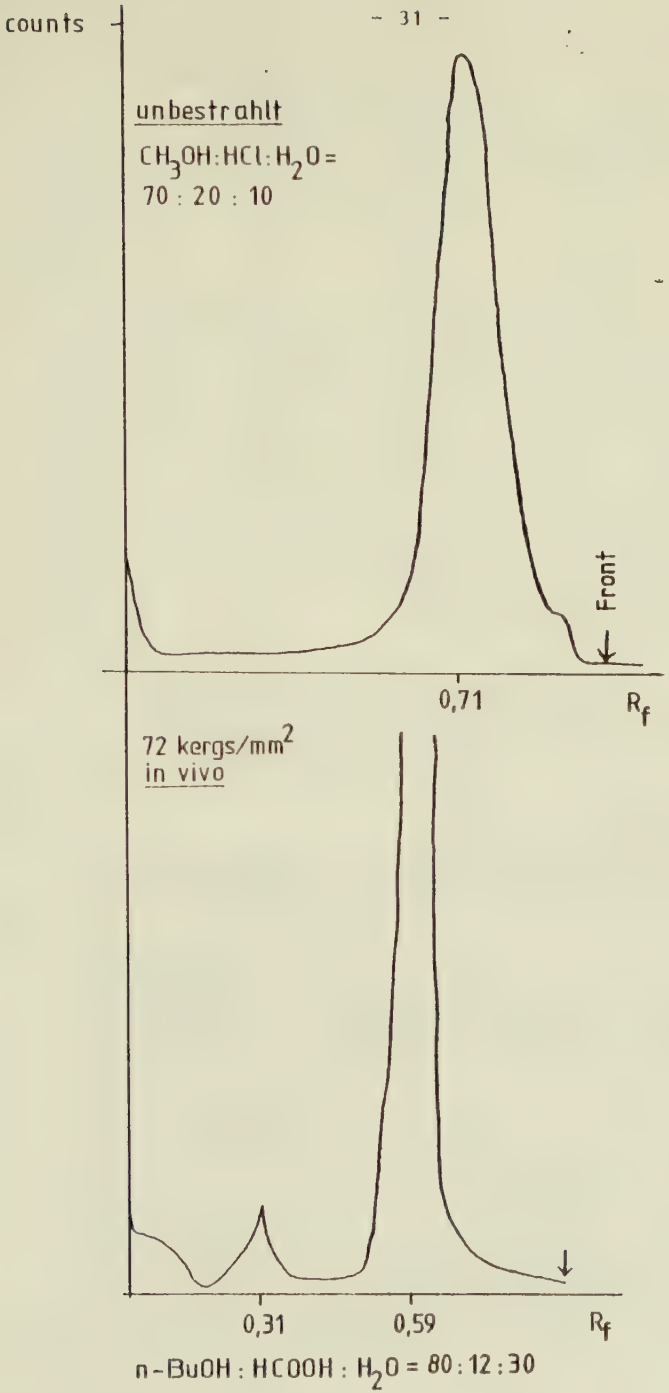


Abb.: 7 u. 8: DC - Chromatogramm des DNA - Hydrolysats.
oben: unbestrahlte Tiere
unten: 72 kergs/mm^2, Lyse sofort.

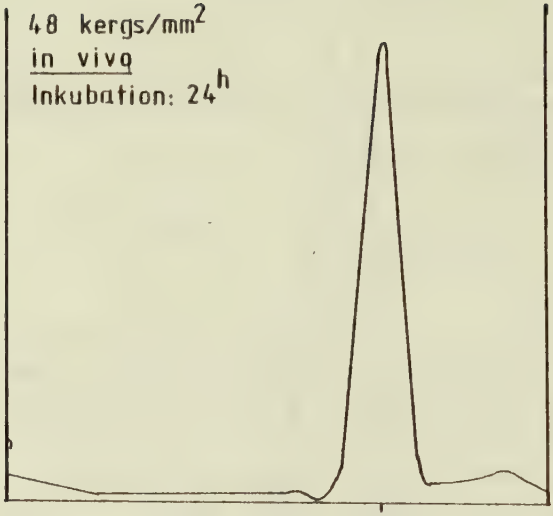


Abb.: 9 DC - Chromatogramm des DNA - Hydrolysats. 48 kergs/mm^2. Lyse 24 h nach Bestrahlung.

Statistische Betrachtung.

Trägt man die UV - Dosis gegen den Prozentsatz der Dimere linear auf (Abb.: 10), so erhält man einen Kurvenverlauf, der einer ln - Funktion ähnelt.

Mit Hilfe eines Computerprogramms wurde ein Test auf logarithmische Kurvenanpassung durchgeführt:

- Kurvenanpassung an ln - Funktion
  Es ergibt sich folgende Relation zwischen Dosis (D) in kergs/mm^2) und Dimerbildung (TT%)

  $TT\% = -5 + 3 \ln D$

Die Wahrscheinlichkeit ist 72%, daß alle gefundenen Punkte diese Gleichung erfüllen.

Wichtiger ist der Test auf Korrelation zwischen

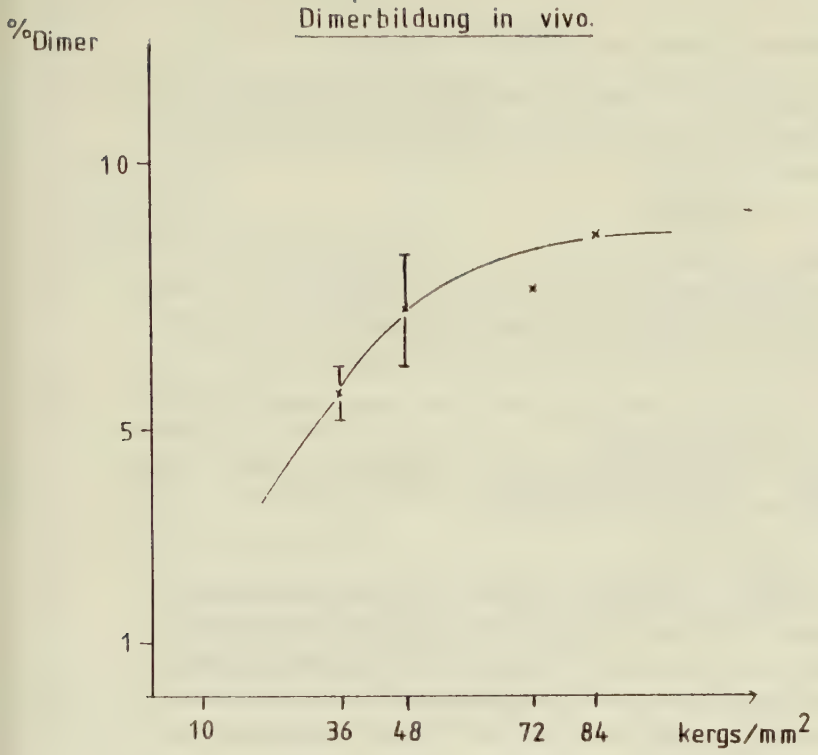


Abb.: 10 Dosisabhängigkeit der Dimerisierungsrate bestrahlter Tiere.

Dimerbildung und Dosis :

- Korrelation.

  Für die einzelnen Meßergebnisse wurde das Bestimmtheitsmaß (r^2) errechnet.

  $r^2 = 0.72$

Der Korrelationskoeffizient (r) ist demnach r = 0.85
In der Signifikanztabelle (Dokumenta GEIGY, 1969)
gilt für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 0.01
(df = 7) r = 0.7977.
Da der gefundene Korrelationskoeffizient über diesem Wert liegt, ist die Korrelation zwischen Dimerbildung und Dosis (auf ln - Basis) gesichert. Die Irrtums-

wahrscheinlichkeit ist kleiner als 1%.

Bei den folgenden Ergebnissen der in vivo Dimerisierung soll auch kurz auf das Verhalten der Tiere eingegangen werden.

- bis 20 kergs/mm^2

  keine sichtbaren Schäden. Die Vermehrungsrate der bestrahlten Tiere entspricht der unbestrahlter Tiere. Die Tiere bewegen sich nach der Bestrahlung normal. Die Nahrungsaufnahme wird nicht beeinflußt.

  In diesem Dosisbereich läßt sich keine Dimerisierung der DNA nachweisen.
  Die Schutzwirkung des Wasser (Wasserhöhe 2mm) könnte eine Schädigung verhindern.

- bis 36 kergs/mm^2

  Die Tiere liegen nach Bestrahlung bewegungslos am Boden. Isoliert man die Tiere und untersucht ihr Teilungsverhalten, so ergibt sich eine Verzögerung, die im Bereich von 50 $\pm$ 15% liegt.
  Leichen treten nicht auf. Die Tiere beginnen 10 h nach Bestrahlung mit der Nahrungsaufnahme.

  Der Prozentsatz der gebildeten Dimere liegt bei 36 kergs/mm^2 im Bereich von 5.7%.
  Da in diesem Dosisbereich alle Tiere überleben und in ihrem Teilungsvermögen nur vorübergehend geschädigt sind, scheinen 5.7% Dimere für alle Zellen reparabel zu sein.

- bis 48 kergs/mm^2

  Nach Einzelisolierung stark verzögerte Teilungsaktivität. Auftreten von Leichen (10%). Die Überlebenden vermehren sich 72 h nach Bestrahlung wie normale Tiere.

  Die Dimerisierungsrate steigt auf 7% an. Isoliert man

die DNA erst 24 h nach Bestrahlung, so findet man keine Dimere mehr (Abb.: 9).
7% Dimere scheinen von den Zellen repariert worden sein.

- bis 72 kergs/mm^2

Die Tiere überleben noch die Bestrahlung, sterben aber zu 90% in den nächsten 10 h ab. Die Überlebenden sind nach 48 h (nach Wasserwechsel) wieder teilungsfähig.

Durch die Bestrahlung wurden 8% Dimere gebildet. 24 h nach Bestrahlung war die Zahl der Überlebenden Tiere zu gering um die DNA auf Dimere untersuchen zu können.

- bis 84 kergs/mm^2

Alle Tiere werden während der Bestrahlung lysiert. Das mikroskopische Bild zeigt, daß die Makronuklei in ihrer Struktur erhalten bleiben.

In diesen Kernen läßt sich eine Dimerisierungsrate von 8.8% nachweisen.

3.1.5.2. In vitro Dimerisierung.

Die in vitro Dimerisierung wurde nach der in (2.2.6.2.) beschriebenen Methode durchgeführt.
Die DNA wurde vor Bestrahlung säulenchromatographisch gereinigt. Das Eluat dieser Reinigung ist in Abb.: 11 dargestellt. Verwendet wurde nur die DNA der Fraktionen 34 bis 44. Weitere Behandlung s. 2.2.6.2.

Nach Hydrolyse und Dünnschichtchromatographie der bestrahlten DNA ergibt sich folgende Tabelle; in der die Dimerisierungsrate der in vitro Bestrahlung der Dimerisierungsrate nach in vivo Bestrahlung (3.1.5.1.) gegenüber gestellt ist :

(s. auch Abb.: 12; Abb.: 13)

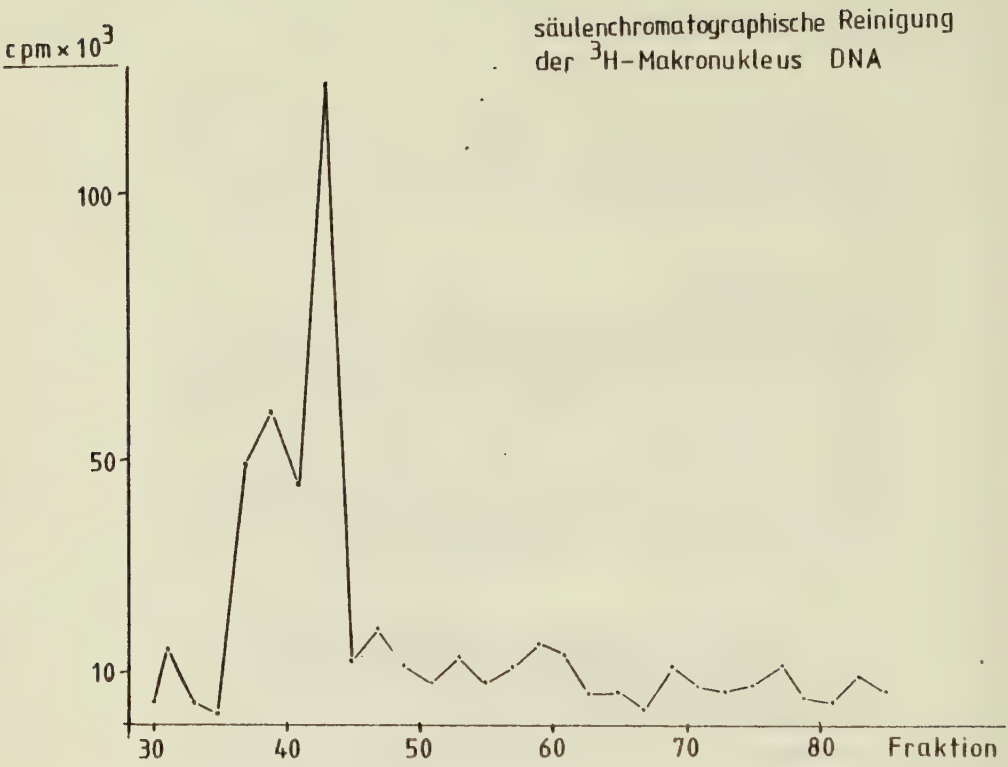


Abb.: 11 Eluat der DNA - Reinigung über einer Sephadex - G - 50 Säule.

Dosis in kergs/mm^2	in vitro Dimerisierung (%)	in vivo Dimerisierung (%)
6	7.5	-
43	30.3	7.7
84	29.4	8.8

Bestrahlt man isolierte DNA, so ist die Dimerisierungsrate etwa vierfach höher als bei der Bestrahlung von Tieren.

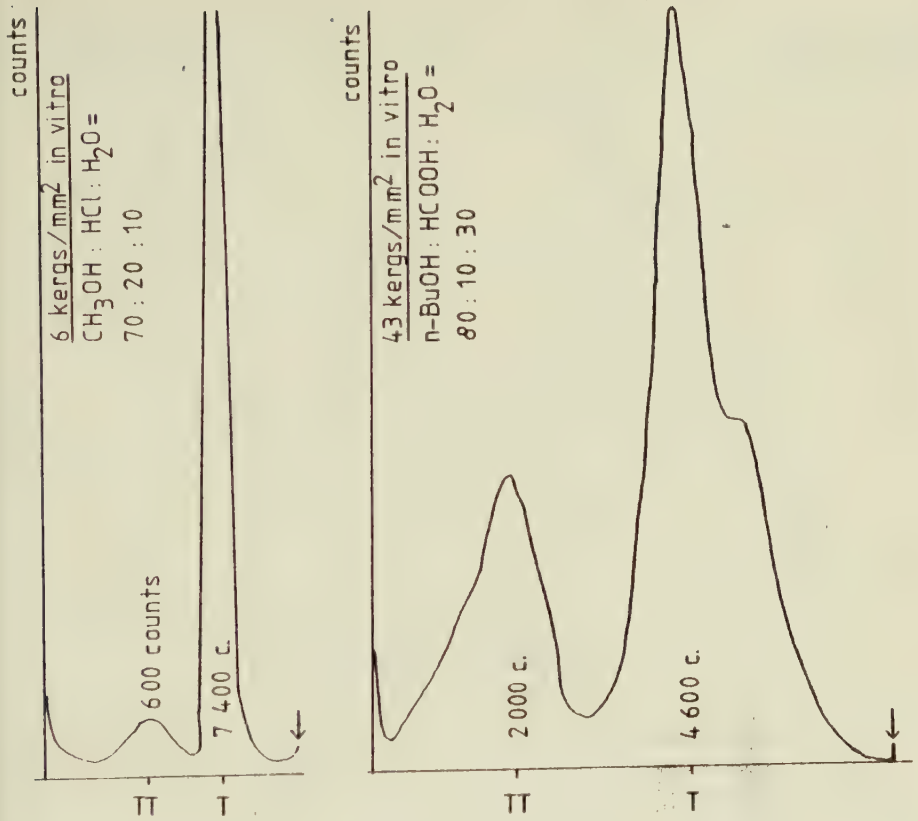


Abb.: 12 Dünnschichtchromatogramme der in vitro - Bestrahlungen.

links: In Phosphatpuffer gelöste DNA mit einer UV - Dosis von 6 kergs/mm^2 bestrahlt.

rechts: In Phosphatpuffer gelöste DNA mit einer UV - Dosis von 43 kergs/mm^2 bestrahlt.
(jeweils Makronukleus - DNA)

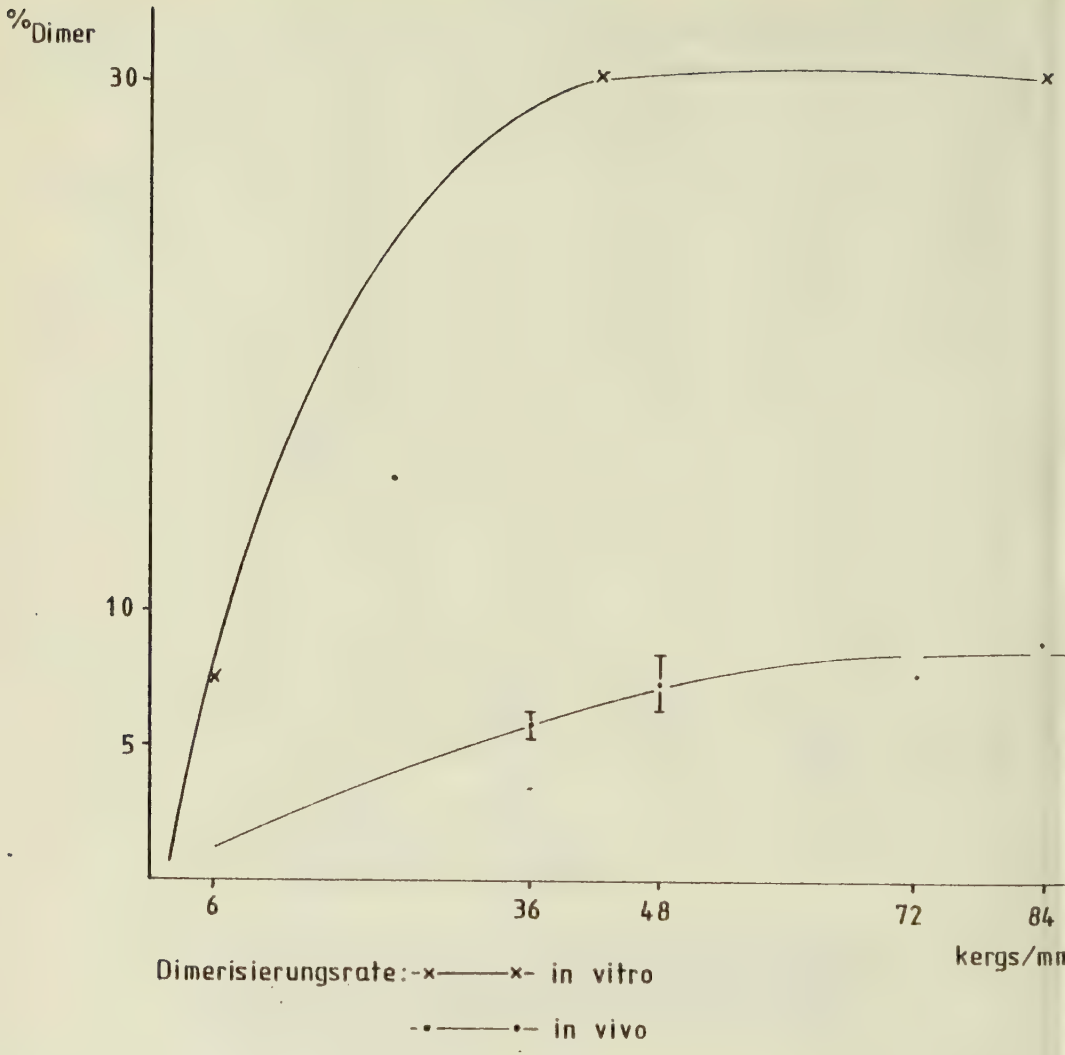


Abb.: 13 Dimerisierungsrate bestrahlter Makronukleus - DNA.
Vergleich:
Dimerisierungsrate bestrahlter Tiere.

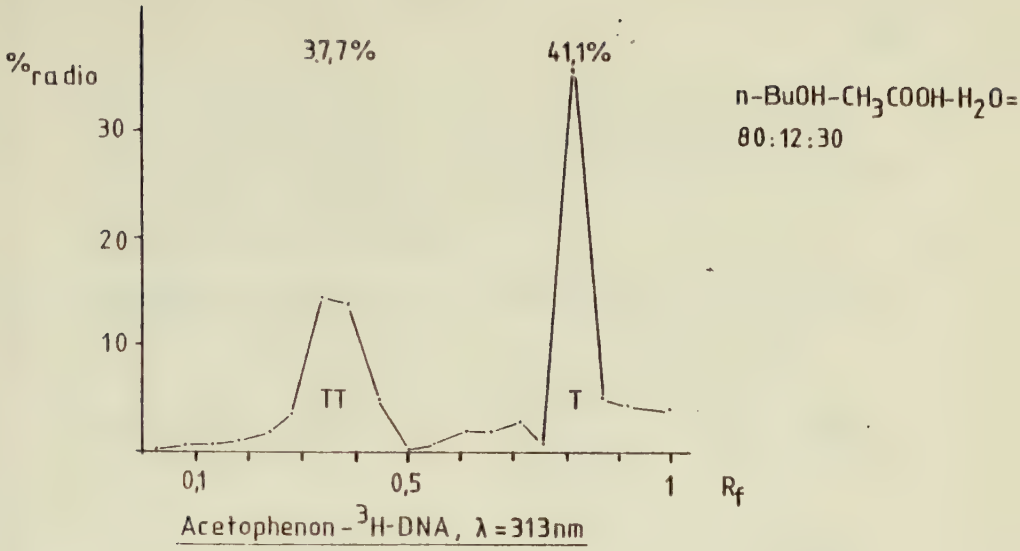


Abb.: 14 Dimerisierungsrate bestrahlter Makronukleus - DNA in Anwesenheit von Acetophenon.

3.1.5.3. In vitro Dimerisierung mit sensibilisierter DNA .

Die Acetophenon - Methode erlaubt es, die potentiell mögliche Zahl der Dimere zu bestimmen, die in einer isolierten DNA gebildet werden können.
Berücksichtigt man den Background (ca. 2%/Fraktion), so ergibt sich nach der Dimerisierungsformel (2.2.6.1.) eine Dimerisierung von :

TT = 48% .

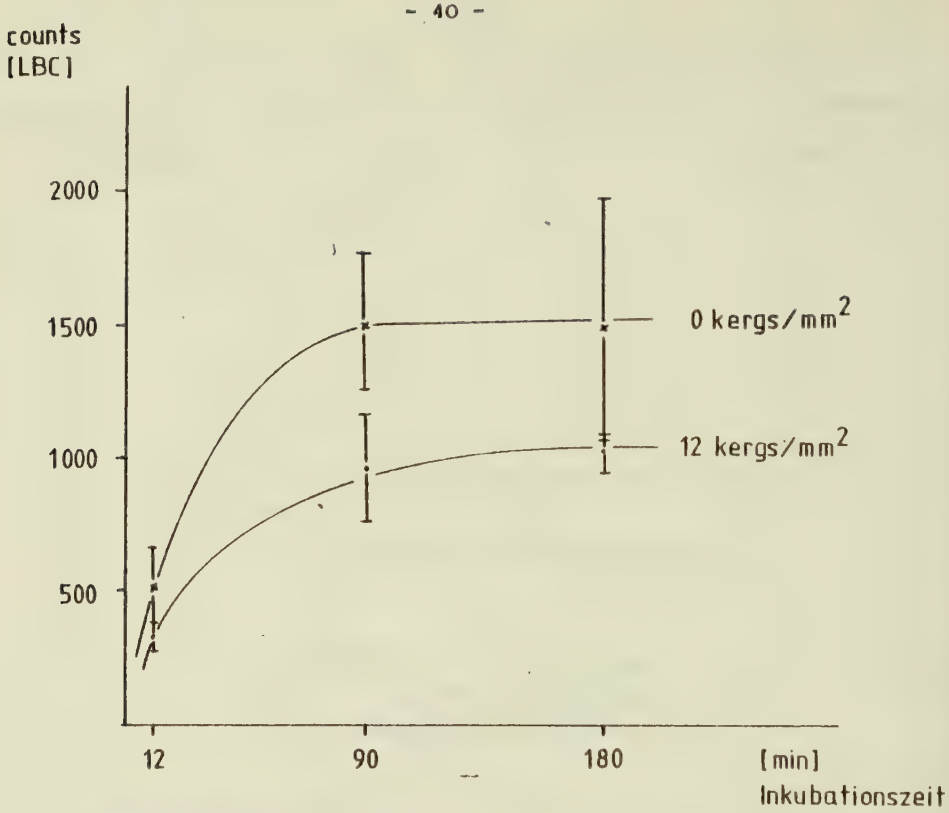


Abb.: 15 Hemmung des Einbaus von ^{3}H-Thymidin in die DNA nach einer Dosis von 12 kergs/mm^2.
Abzisse: Inkubationszeit nach Bestrahlung
Ordinate: radioaktive Zerfälle pro Minute.

2.1.6. Wirkung der UV - Strahlung auf die DNA - Replikation .

In Versuch 3.1.5.1. konnte im Dosisbereich bis 20 kergs/mm^2 keine Dimerisierung in der DNA bestrahlter Tiere nachgewiesen werden.
Im Versuch 3.1.1. wurde gezeigt, daß die S-Phase empfindlicher gegen UV - Licht reagiert als die G_1-Phase.
Es stellt sich daher die Frage, ob bei niedrigen Dosisbereichen die DNA - Replikation beeinflußt wird.

In der folgenden Tabelle wird der Zusammenhang zwischen eingestrahlter UV - Dosis und Aufnahme externem Thymidins in die DNA dargestellt.
Dieser Einbau wurde für drei verschiedenen Zeiten (12, 90 und 180 min) bestimmt:

UV-Dosis kergs/mm^2	Inkubations-zeit (min)	Zerfälle/min	s
0	12	513	172
1.2	12	564	70
6	12	489	41
12	12	386	59
0	90	1502	264
1.2	90	1702	82
6	90	1164	243
12	90	961	209
0	180	1487	498
1.2	180	2038	490
6	180	1169	261
12	180	1043	72

Die Unterschiede der Werte im Bereich bis 6 kergs/mm^2 sind nicht signifikant.

Eine deutliche Verminderung der Einbaurate zeigt sich, wenn man die Werte der mit 12 kergs/mm^2 bestrahlten Tiere mit den unbestrahlten vergleicht: (Abb.: 15)

Dosis kergs/mm^2	Inkubations-zeit (min)	Zerfälle/min
0	12	513 $\pm$ 172
12	12	386 $\pm$ 59
0	90	1502 $\pm$ 264
12	90	961 $\pm$ 209
0	180	1487 $\pm$ 498
12	180	1043 $\pm$ 72

3.2. Röntgenstrahlung.

3.2.1.Dosis und Überlebensrate.

Während schon die Protozoen gegenüber ionisierenden Strahlen den resistentesten Tierstamm bilden (GLASER, 1971), sind unter ihnen die Ciliaten am unempfindlichsten.

Dies unterstreicht auch die Meßreihe, die an Stylonychia mytilus - Ami durchgeführt wurde.

Aus Abb.: 16 folgt :

- 0 bis 330 000 R.
  keine Minderung der Überlebensrate.
- 330 000 bis 1 400 000 R.
  mit steigender Dosis nimmt die Überlebensrate gut gefütterter Tiere ab.
- 1 600 000 R.
  Tiere, die kurz vor der Bestrahlung gefüttert wurden, lagen nach Bestrahlung bewegungslos am Boden. Nach etwa 30 Minuten waren alle Zellen lysiert.
  Tiere, die zum letzten Mal 24 h vor der Bestrahlung gefüttert wurden, überlebten diese Dosis.

Nach Bestrahlung wurde im Abstand von 24 Stunden ausgezählt, wieviele Tiere noch vorhanden waren (N). Dieser Wert wird zu der Anzahl der unbestrahlten Tiere in Verbindung gesetzt (N_o).

Aus dem Quotienten N/N_o ergiht sich die Überlebensrate (Abb.: 16).

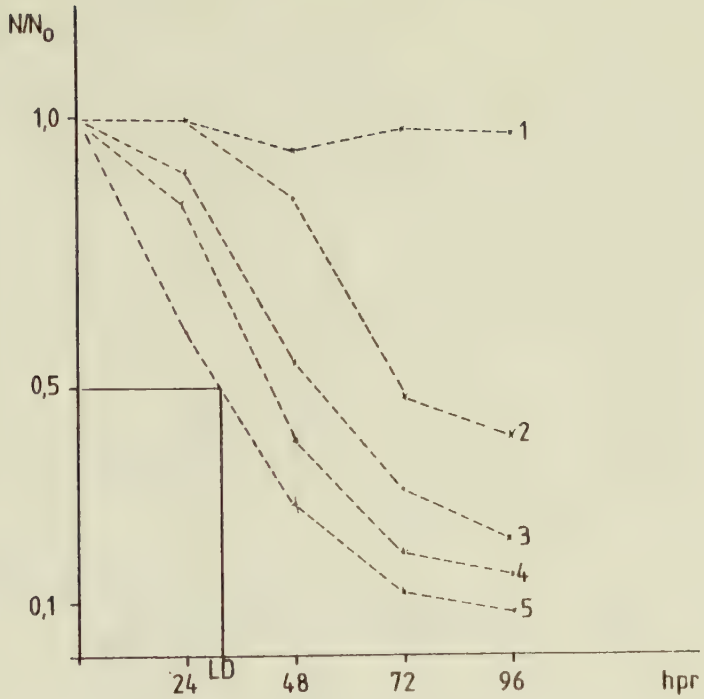


Abb.: 16 Überlebensrate der bestrahlten Tiere (N) in Bezug zu den unbestrahlten Tieren (N_o)
hpr : Stunden nach Bestrahlung

1) 0.33 x 10^6 R
2) 0.80 x 10^6 R
3) 1.00 x 10^6 R
4) 1.20 x 10^6 R
5) 1.40 x 10^6 R

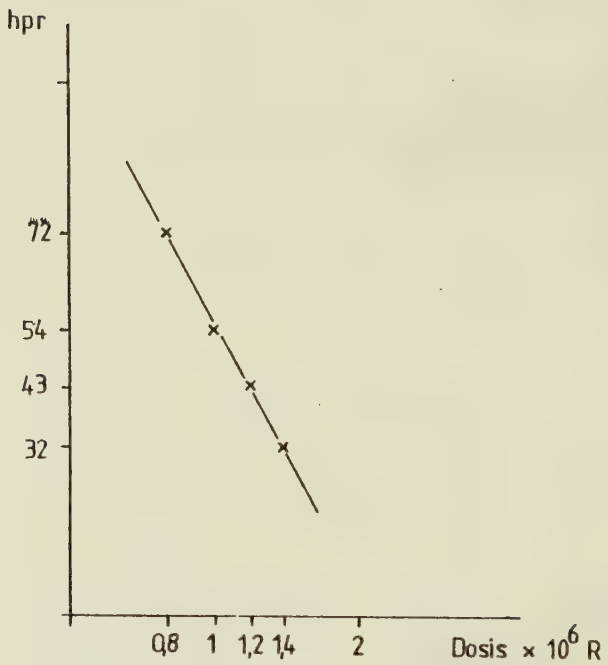


Abb.: 17 LD_{50} - Wert in Abhängigkeit der eingestrahlten Dosis.

Durch zeichnerische Bestimmung aus Abb.: 16 erhält man die Zeit (in h), zu der durch eine bestimmte Dosis die Zahl der Tiere um 50% vermindert ist. Dies ist der LD_{50}- Wert. (GLASER, 1971)

Dabei ergibt sich zwischen Dosis (in R) und LD_{50}- Wert (in hpr = Stunden nach Bestrahlung) folgende Korrelation :

$$hpr = 1021 - 70 \ln D$$

(HEWLETT PACKARD, Curve fitting program)

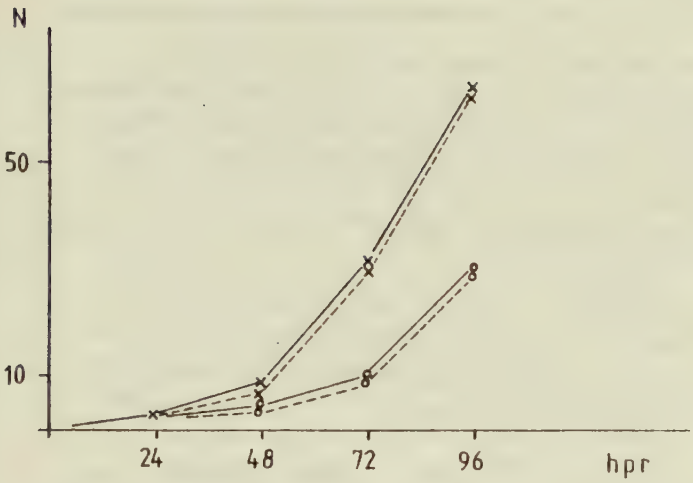


Abb.: 18 Teilungsverhalten nach Coffeinzugabe (0.01%). Erklärung im Text.

3.2.3. Coffeinempfindlichkeit.

Während in den älteren Arbeiten (METZGER, 1964) eine Strahlensensibilisierung durch Coffein als Blockierung der Excisionsreparatur gedeutet wurde, ist es heute sicher, daß bei Eukaryonten die schädigende Wirkung auf Hemmung der Postreplikationsreparatur zurück geht. (LETT & ADLER, 1978; HAUGLI, 1972).

Niedrige Konzentrationen von Coffein im Nährmedium von Physarum hemmen nicht die Zellteilung. Erst ab einer bestimmten Grenzkonzentration wird zunehmend die Zellteilungsrate herabgesetzt. Bei der Grenzkonzentration ist die Vermehrungsrate in Anwesenheit von Coffein noch gleich der ohne Coffein.
Setzt man Zellen in Anwesenheit von Coffein (der Grenzkonzentration) einer Strahlung aus, so findet man eine

starke Abnahme der Überlebensrate im Vergleich zu den Tieren, die mit derselben Dosis in Abwesenheit von Coffein bestrahlt wurden (HAUGLI & DOVE, 1972).

Dies beruht auf Blockierung der Postreplikationsreparatur.

Die oben beschriebene Grenzkonzentration ist für Stylonychia mytilus 0.01% (w/v) Coffein. Oberhalb dieser Konzentration nimmt die Überlebensrate schnell ab. Bei 0.05% Coffein im Nährmedium überleben keine Tiere länger als 4 Tage.
Der Grenzkonzentrationswert ist bei Physarum 0.025% (HAUGLI & DOVE, 1972).

Die folgende Tabelle zeigt die Zahl der Tiere 24, 48, 72 und 84 Stunden nach Bestrahlung (hpr). Verglichen werden unbestrahlte Tiere mit und ohne Coffein der Grenzkonzentration:

	24	48	72	96	(hpr)
unbestrahlt ohne Coffein	2	8	31±1.4	64±8.4	X————X
unbestrahlt mit Coffein	2	8	31±1.7	63±8.5	X-------X

Die folgende Tabelle zeigt die Verhältnisse bei Bestrahlung ohne und mit Coffein (0.01%) :

	24	48	72	96	(hpr)
10^6 R ohne Coffein	1.8	4.4	9.5±2.5	28±8	O————O
10^6 R mit Coffein	2	4.2	9.2±1.9	30±7	O-------O

Aus der letzten Tabelle geht hervor, daß durch Coffein keine Sensibilisierung der Zellen gegenüber einer Strahlung von 10^6 R erfolgt. Da bei Zellen,die eine Postreplikationsreparatur besitzen (s.o.) unter diesen Bedingungen eine Abnahme der Teilungsrate zu beobachten ist, muß bei Stylonychia mytilus auf Abwesenheit von Postreplikationsreparatur geschlossen werden.

3.2.4. Autoradiographische Methoden zur Bestimmung der DNA - Neusynthese.

In diesem Versuch wurden die Bedingungen des UV - Versuches (2.2.4.) eingehalten.
Die UV - Bestrahlung wurde durch Röntgenbestrahlung ersetzt. Während nach UV - Bestrahlung keine atypische DNA - Synthese nachgewiesen werden konnte (3.1.3.), zeigen Abb.: 19, 20 und 21 (s.Anhang),daß nach Röntgenbestrahlung andere Ergebnisse vorliegen.

Hier tritt nach Bestrahlung eine deutliche replikationsunabhängige DNA - Neusynthese auf.
Eine solche atypische DNA - Synthese ist charakteristisch für die Excisionsreparatur. (KÖRNER, 1976)

Die Excisionsreparatur geschieht unbahängig von der Kernphase des Tieres.
Abb.: 20 zeigt, daß sich das Tier in der G_1 - Phase befand. Wie im Autoradiogramm sichtbar, ist über den ganzen Makronukleus hinweg eine deutliche Neusynthese von DNA nachzuweisen.

Dies gilt auch für Abb.: 21:
Wie das Replikationsband zeigt, befand sich das Tier in der S - Phase. Auch hier lief eine atypische DNA - Synthese ab. Stylonychia ist für solche Untersuchungen ein sehr geeignetes Objekt, da sich die Replikation der DNA nur im Replikationsband vollzieht. So erkennt man schon aus der räumlichen Lage der Markierungen, ob es sich um atypische DNA - Synthese handelt.

3.2.5. Analytische Methoden zur Messung der DNA - Einzelstrangbrüche.

3.2.5.1. Einzelstrangbrüche in den Makronuklei nach in vivo Bestrahlung.

Eine energetische Betrachtung zeigt, daß die Energiebilanz für das Entstehen von Einzelstrangbrüchen spricht.

Die verwendete Strahlung hatte eine Energie von 1 200 eV. Für einen Einzelstrangbruch sind nach BACQ & ALEXANDER (1958) 20 eV, nach LETT (1970) 60 $\pm$ 10 eV aufzuwenden.

Zur Prüfung auf Einzelstrangbrüche wurde die Methode des diskontinuierlichen, alkalischen Dichtegradienten verwendet.

Abb.: 22 zeigt, daß durch in vivo Bestrahlung das Molekulargewicht der DNA Einzelstränge stark veringert wurde (Fraktion 3, 5 und 8).
24 Stunden nach Bestrahlung sind diese Einzelstrangbrüche nicht mehr nachweisbar. Es tritt nur noch ein hochmolekularer Peak auf (Fraktion 9 + 10).

Dieser unterscheidet sich nicht vom Sedimentationsprofil der DNA unbestrahlter Tiere.

Die Einzelstrangbrüche sind also in diesem Zeitraum (24 h) repariert worden.

3.2.5.2. Einzelstrangbrüche nach in vivo Bestrahlung in den Mikronuklei.

Da Mikronukleus - DNA im Gegensatz zur Makronukleus-DNA sehr hochmolekular ist, sind auch bei schonender Behandlung Brüche nur schwer vermeidbar (LIPPS & STEINBRÜCK, 1978). Daher treten auch im Sedimentationsprofil der unbestrahlten DNA Strangbrüche auf.
Um einen genauen Vergleich zwischen unbestrahlter und bestrahlter DNA des Mikronukleus ziehen zu können, wurde exakt dieselbe Menge an Radioaktivität aufgetragen (fe 3 x 10^4 cpm).

Im Sedimentationsprofil (Abb.: 23) zeigt die bestrahlte Mikronukleus - DNA (O-----O) den gleichen hochmolekularen Peak wie die unbestrahlte (X———X) . (Unbestrahlt: Fraktion 15, 16 ; bestrahlt : Fraktion 14, 15).

Nach den Arbeiten von AMMERMANN et al. (1974) ist der niedermolekulare Peak nur als Abbauprodukt

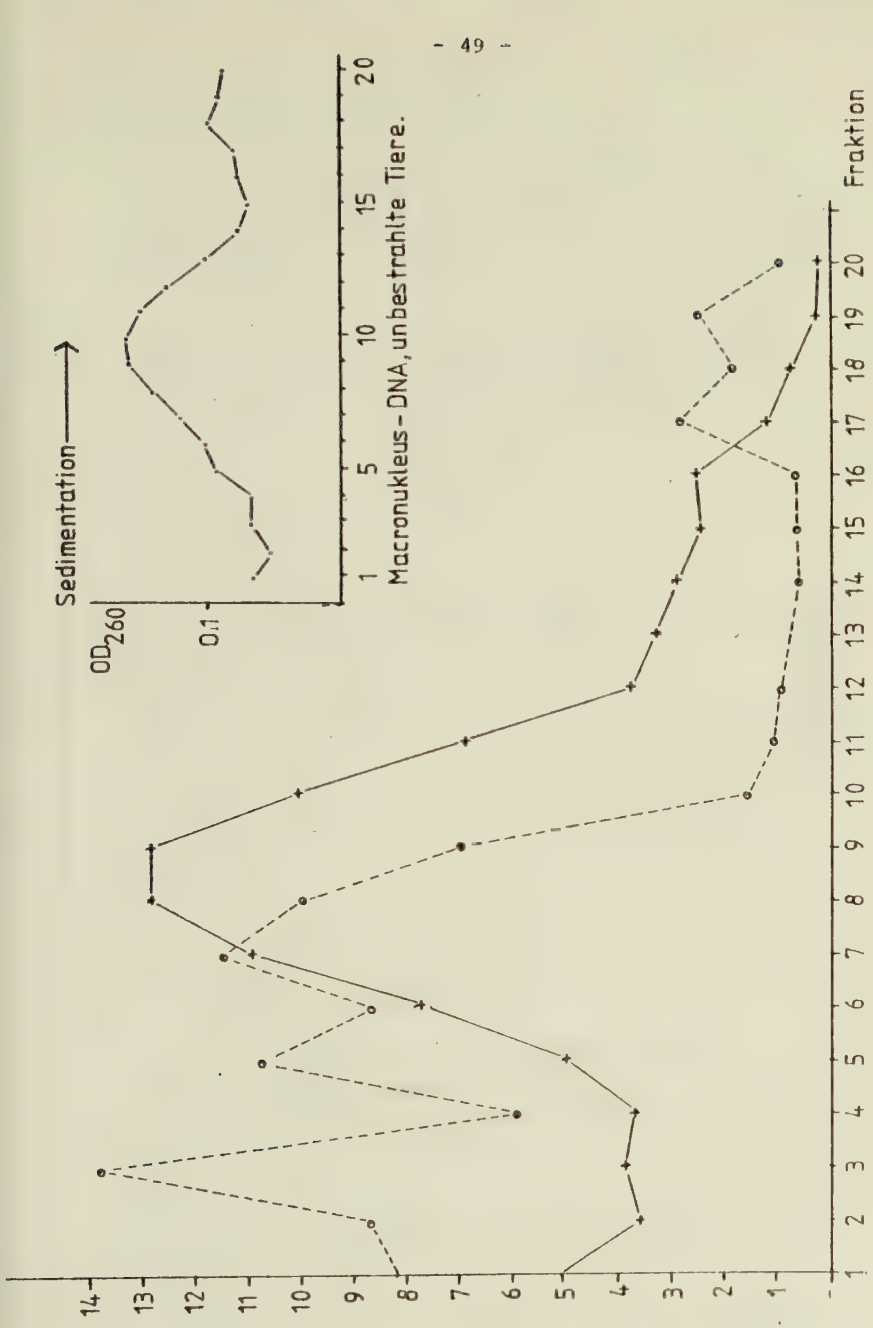
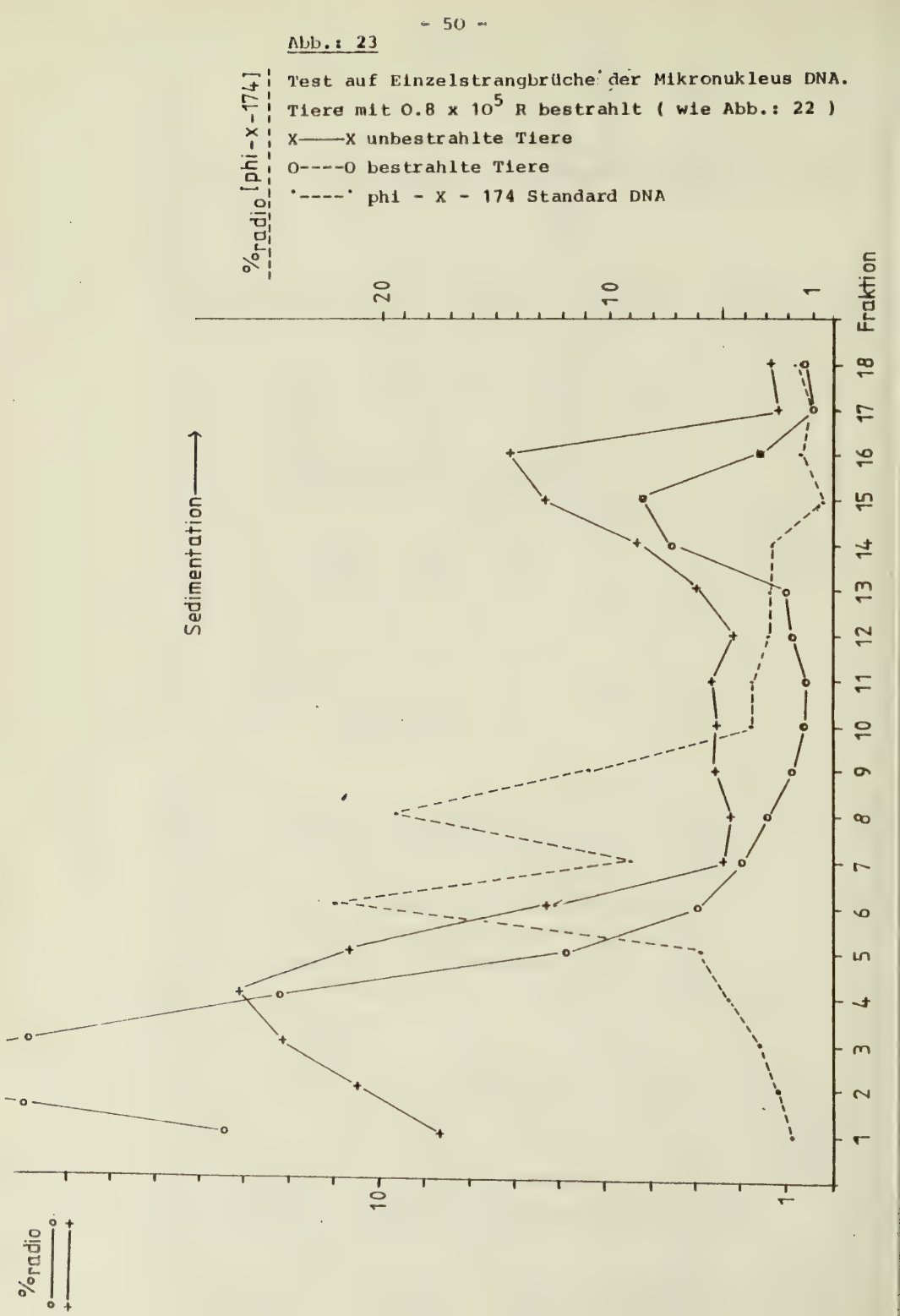


Abb.: 22 Test auf Einzelstrangbrüche in der Makronukleus DNA nach in vivo Bestrahlung.
O----O DNA sofort nach Bestrahlung isoliert
X——X DNA 24 h nach Bestrahlung isoliert
zum Vergleich Makronukleus DNA unbestrahlter Tiere.
Diskontinuierlicher, alkalischer Saccharosegradient.

Abb.: 23

Test auf Einzelstrangbrüche der Mikronukleus DNA.
Tiere mit 0.8 x 10^5 R bestrahlt (wie Abb.: 22)
X——X unbestrahlte Tiere
O----O bestrahlte Tiere
'-----' phi - X - 174 Standard DNA



des hochmolekularen Peaks zu deuten.
Dabei ist der hochmolekulare Peak der unbestrahlten DNA insgesamt höhermolekular als der der bestrahlten Tiere. Durch die Bestrahlung ist der hochmolekulare Peak zugunsten des niedermolekularen abgebaut worden. (Im hochmolekularen Peak der unbestrahlten DNA befinden sich 28% der Gesamtradioaktivität, während im hochmolekularen Peak der bestrahlten DNA nur noch 12% der Gesamtradioaktivität zu finden sind).

Setzt man die beiden Peaks in Beziehung zur Standard - - DNA (phi - X-- 174, 16 S $\hat{=}$ 1.82 x 10^6 D), so hat der hochmolekulare Peak ein wesentlich höheres Molekulargewicht.
Die Abbauprodukte (ob durch Präparation oder Bestrahlung + Präparation entstanden) liegen deutlich unter diesem Wert von 16 S.
Da nach Bestrahlung bei diesem mikronukleushaltigen Stamm ein Teil der Tiere abstarb, war es nicht möglich 24 h nach Bestrahlung soviel Mikronukleus - DNA zu erhalten, daß ein Vergleich wie im vorigen Experiment möglich war.

3.2.6. Agarose - Gel Methoden zur Bestimmung der DNA Doppelstrangbrüche.

3.2.6.1. Doppelstrangbrüche nach Bestrahlung isolierter Mikro- und Makronuklei.

Bei einer Dosis von 5 x 10^5 R erwartet man eine starke Schädigung der DNA. Strahlendosen dieser Größe verursachen sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche (KÖRNER, 1976).

In diesem Versuch wurde die native DNA der Mikro- und Makronuklei bestrahlt und auf Doppelstrangbrüche untersucht.

In Abb.: 24 ist deutlich erkennbar, daß sowohl bei bestrahlten Makronuklei (Bande 1 + 2) als auch bei bestrahlten Mikronuklei (Bande 5 + 6) der hochmole-

kulare Anteil,der DNA definitiv nicht mehr auf dem Gel zu finden sind. Dieser hochmolekulare Bereich entspricht etwa 14 x 10^6 D (LIPPS & STEINBRÜCK, 1978). Bei den Makronukleus Fraktionen herrscht weitgehende Übereinstimmung im Bereich der niedermolekularen DNA (0.3 x 10^6 D, LIPPS & STEINBRÜCK, 1978).

Anders sieht das Elektrophorese-Muster für die niedermolekularen Mikronukleus - Fraktionen aus. Hier wandert die bestrahlte DNA wesentlich weiter in das Gel als die unbestrahlte. Sie hat durch die Bestrahlung ein niedrigeres Molekulargewicht erhalten.

Da in der bestrahlten Mikronukleus - DNA die hochmolekularen Bereiche nicht mehr zu erkennen sind, müssen durch die Röntgenbestrahlung Doppelstrangbrüche induziert worden sein. Die dadurch entstandenen Molekulargewichte erreichen Größenordnungen, die in unbestrahlter Mikronukleus - DNA nicht zu finden sind.

Die hier an der Mikronukleus - DNA gemachten Beobachtungen treffen teilweise auch für die Makronukleus - DNA zu. Auch hier ist die hochmolekulare DNA der unbestrahlten Makronuklei (Bande 3 + 4) bei der Bestrahlung durch Doppelstrangbrüche zersetzt worden (Bande 1 + 2).
Vergleicht man die niedermolekularen Bereiche der Makronukleus - DNA, so sieht man, daß die Molekulargewichte für bestrahlte und unbestrahlte DNA in diesem Bereich identisch sind. Daraus folgt, daß die hochmolekulare DNA in Teile zerlegt wurde, die nicht kleiner sind als die ohnehin im Makronukleus existierenden niedrigsten Molekulargewichte.

Bei einem Vergleich zwischen den Doppelstrangbrüchen der Makronukleus - DNA mit denen der Mikronukleus - DNA wird deutlich, daß bei der Mikronukleus - DNA der geschädigte Anteil der hochmolekularen Fraktion einen größeren Bereich umfaßt. Im niedermolekularen Bereich sind beide nach Bestrahlung weitgehend gleich.

3.2.6.2. Doppelstrangbrüche nach in vivo Bestrahlung.

Zur Darstellung des Reparaturverhaltens von Doppelstrangbrüchen wurde ebenfalls die Methode 3.2.6. gewählt. In Abb.: 25 (Anhang) wurde die Makronukleus - DNA von unbestrahlten und bestrahlten Tieren verglichen. Letztere wurden sofort nach Ende der Bestrahlung (Abb.: 25, Bande 2) oder 24 h nach Bestrahlung (Bande 3) lysiert.

Der Vergleich mit Bande 1 (unbestrahlte Tiere) zeigt, daß durch in vivo Bestrahlung mit 80 000 R Doppelstrangbrüche gebildet werden, die zu einer DNA mit niedrigerem Molekulargewicht führen.
Diese Fraktion ist bei Tieren, deren Kerne und DNA erst 24 h nach Bestrahlung isoliert wurden, nicht zu finden (Bande 3).

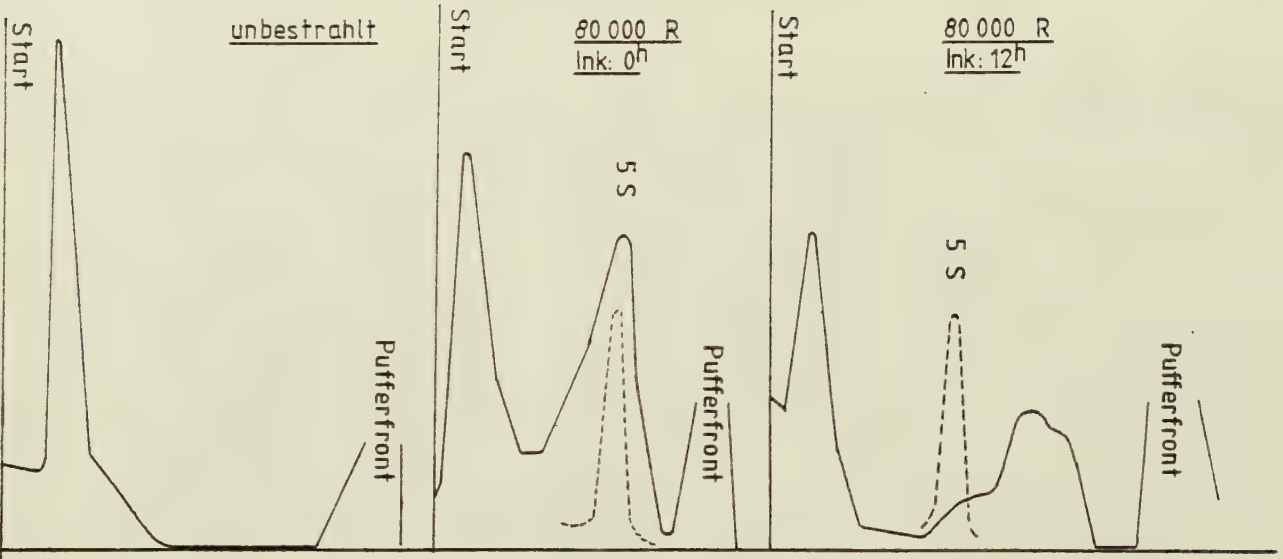
Das bedeutet, daß in dieser Inkubationszeit die durch Bestrahlung gebildeten niedermolekularen Doppelstränge den Kern verlassen haben (als solche oder enzymatisch weiter abgebaut) oder daß sie durch Reparatur ihr "altes" Molekulargewicht wieder erreicht haben.

Die Ergebnisse der UMSP - Messungen (3.2.9.) zeigen, daß ein Ausschleusen von DNA aus dem Makronukleus nach Bestrahlung nicht vorkommt. Man muß daher annehmen, daß die Doppelstrangbrüche durch Wiedervereinigung (rejoining) repariert werden.

3.2.7. Polyacrylamid - Gel Methoden zur Bestimmung von Makronukleus - DNA Fragmenten.

Die Polyacrylamid - Gel Methode erlaubt bei sehr kurzen Laufzeiten eine Abtrennung niedrigmolekularer DNA von hochmolekularer.

Abb.: 26.1 zeigt das Verteilungsmuster der Makronukleus - - DNA von unbestrahlten Tieren auf dem Röhrchengel. Hier tritt nahe am Startpunkt der Hauptpeak auf. Er



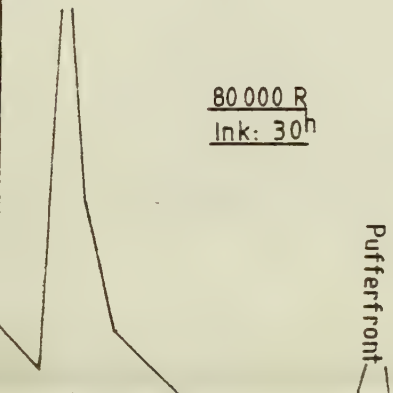


Abb.: 26.1 (oben links). Chromatogramm der Makronukleus - DNA unbestrahlter Tiere.

Abb.: 26.2 (oben Mitte). Chromatogramm der Makronukleus - DNA bestrahlter Tiere (80 000 R). DNA sofort nach Bestrahlung isoliert.

Abb.: 26.3 (oben rechts). Wie 26.2, jedoch 12 h nach Bestrahlung isoliert.

Abb.: 26.4 (unten). Wie 26.2, DNA 30 h nach Bestrahlung isoliert.

enthält die Makronukleus - DNA. In der Pufferfront befinden sich neben Nukleotiden auch durch Präparation entstandene Verunreinigungen.

In Abb.: 26.2 wurde die DNA der bestrahlten Tiere sofort nach Bestrahlung mit 80 000 R isoliert. Hier tritt eine zweite Bande auf. Die in einem Parallelgel mitgelaufene 5 S RNA bandet etwa in diesem Bereich.

Auch in der DNA, die etwa 12 h nach Bestrahlung isoliert wurde (Abb.: 26.3) tritt diese zweite Bande auf. Sie befindet sich noch in dem 5 S Bereich.
Auf Grund dieses Standard repräsentiert dieser Bereich etwa 140 - 200 Basenpaare.
Man darf diesen niedermolekularen Peak nicht so interpretieren, daß er die Menge an DNA die durch Bestrahlung freigesetzt wurde zeigt, sondern nur die Strangbrüche. Bei den durch die Bestrahlung entstandenen Brüchen verbleibt die DNA im Komplex mit ihrem Nukleoprotein (DUBININ, 1964). Erst durch die Präparation wird die zwischen den Brüchen liegende DNA freigesetzt. Da die DNA zwischen den Brüchen etwa 140 - 200 Basenpaare groß ist müssen die Brüche etwa in diesem Abstand auseinanderliegen.

Abb.: 26.3 zeigt, daß auch noch 12 h nach Bestrahlung noch Brüche in der DNA vorliegen. Erst 30 h nach Bestrahlung (Abb.: 26.4) unterscheidet sich das Elektrophoresechromatogramm nicht mehr von dem der unbestrahlten Tiere (26.1). Zu dieser Zeit sind dann keine Brüche mehr in der DNA vorhanden.

3.2.8. Kinetische Methoden zur DNA - Neusynthese mit Hydroxyharnstoff.

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluß die Röntgenstrahlung auf die DNA - Synthese von Stylonychia hat.
In Abb.: 27 wird deutlich, daß bei unbestrahlten Tieren

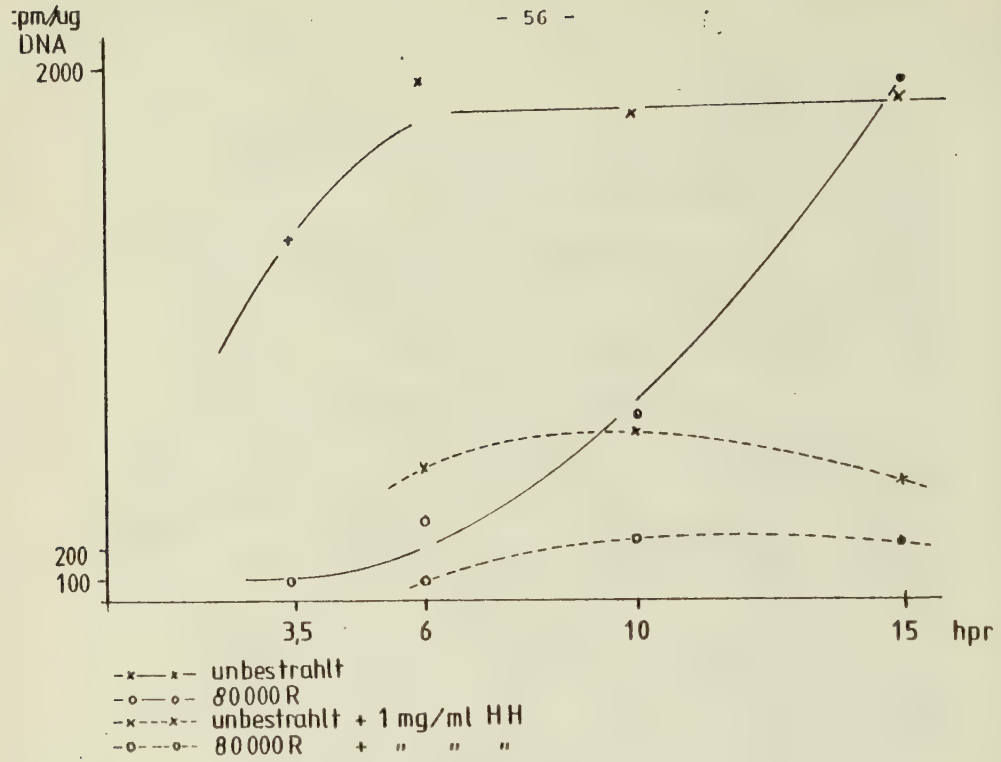


Abb.: 27 Einbau von ^{3}H - TdR in die DNA.
HH = Hydroxyharnstoff.

in den ersten 6 Stunden nach Zugabe von ^{3}H-TdR ein starker Anstieg des radioaktiven Einbaus in die DNA stattfindet. In der folgenden Zeit verläuft die Einbaurate (in cpm/ug) auf konstantem Niveau.
Tiere, die mit 80 000 R bestrahlt wurden, zeigen in den ersten 6 Stunden nach Bestrahlung einen stark verzögerten Einbau von ^{3}H - TdR.
Nach dieser Verzögerungsperiode steigt bei den bestrahlten Tieren die Einbaurate stark an. Nach etwa 15 Stunden ist sie mit der Einbaurate unbestrahlter Tiere identisch.

Auf Grund der Autoradiogramme beruht der Einbau von ^{3}H-TdR nach Bestrahlung auf 2 Vorgängen :

- der DNA - Replikation
- der Excisionsreparatur (s. Diskussion)

Beiden Vorgängen ist gemeinsam, daß sie mit einem Ein-

bau von Nukleotiden verbunden sind.

Da bis heute kein Wirkstoff bekannt ist, der spezifisch die Excisionsreparatur hemmt, wurde Hydroxyharnstoff unter folgender Überlegung verwendet :

Um die nach Bestrahlung entstandenen Stranglücken aufzufüllen müssen in der Zelle Desoxyribonukleotide bereitgestellt werden. Diese werden zum Teil aus den Ribonukleotiden gebildet. Diese Bildung wird durch Hydroxyharnstoff blockiert (SINCLAIR, 1965; ELFORD, 1968).
Der dadurch entstehende Mangel an Desoxyribonukleotiden hemmt die DNA - Replikation. Da auch die Excisionsreparatur Desoxyribonukleotide benötigt, müßte durch das gleichzeitige Ablaufen beider Prozesse das Defizit durch Anwesenheit von Hydroxyharnstoff noch größer werden.

Der Kurvenverlauf in Abb.: 27 zeigt, daß bei einer Konzentration von 1 mg/ml Hydroxyharnstoff die DNA - Replikation stark gehemmt ist. Noch stärker werden die bestrahlten Zellen gehemmt:

Stunden nach ^{3}H-TdR	ohne HH cpm/µg	1 mg/ml HH cpm/µg	%-Einbau nach HH
6	1959	507	21%
6 + 80 kR	307	86	22%
10	1802	684	28%
10 + 80 kR	682	255	27%
15	1863	429	19%
15 + 80 kR	1915	241	11%

In den ersten 10 Stunden nach Bestrahlung ist die Einbauhemmung nach Bestrahlung etwa genauso groß wie die Hemmung ohne Bestrahlung. Während aber 15 h nach Bestrahlung die Einbaurate ohne HH zwischen bestrahl-

ten und unbestrahlten Tieren gleich ist, wird der Unterschied bei HH - Inkubation wesentlich größer. Hier beträgt die Einbaurate von unbestrahlten Zellen 19%. Bei den bestrahlten Zellen erreicht sie nur noch 11%.

Es scheint, daß in den ersten 10 h nach Bestrahlung durch die geringe Intensität der DNA - Replikation bei HH - Anwesenheit keine wirksame Konkurenz um die vorhandenen Desoxyribonukleotide auftritt. Diese wird erst nach einer Inkubationszeit von 15 Stunden deutlich.

3.2.9. DNA - Mengen in den Kernen nach in vivo Bestrahlung.

Die statistische Auswertung der UMSP - Messungen ergibt, daß der DNA - Gehalt 20 h nach Bestrahlung gleich dem unbestrahlter Tiere ist.

Das gilt sowohl für Makro- als auch für Mikronuklei:

$Makro_{unbestr.}$: $\bar{x} = 465.85$; $s = 56.05$; $n = 10$
$Makro_{80\ kR}$: $\bar{x} = 477.83$; $s = 13.21$; $n = 10$
$Mikro_{unbestr.}$: $\bar{x} = 10.18$; $s = 0.96$; $n = 10$
$Mikro_{80\ kR}$: $\bar{x} = 10.96$; $s = 0.87$; $n = 10$

Auch 30 h nach Bestrahlung ist der Unterschied im DNA - Gehalt nicht signifikant :

$Makro_{unbestr.}$: $\bar{x} = 412.69$; $s = 59.19$; $n = 10$
$Makro_{80\ kR}$: $\bar{x} = 445.92$; $s = 45.75$; $n = 10$
$Mikro_{unbestr.}$: $\bar{x} = 10.26$; $s = 1.01$; $n = 10$
$Mikro_{80\ kR}$: $\bar{x} = 10.83$; $s = 0.27$; $n = 10$

4. Diskussion

4.1. UV - Bestrahlung

Die Analyse von Zusammenhängen zwischen einer bestimmten UV - Dosis und einer biologischen Wirkung (hier Teilungsverzögerung) muß im Sinne der formalen Treffertheorie interpretiert werden.

Sie beruht auf der Überlegung daß in einem biologischen System neuralgische Punkte bestehen. Ein neuralgischer Punkt ist das DNA - Molekül.
Der Primärvorgang, die Strahlenschädigung des neuralgischen Moleküls,wird als Treffer bezeichnet.
Ein solcher Treffer führt zur Zerstörung oder Veränderung des Moleküls.
Die wichtigste Veränderung nach UV - Bestrahlung ist die Bildung von Thymin - Dimeren (WACKER et al., 1966; SETLOW & CARRIER, 1966; BRUNK, 1973).

Solche Treffer lösen eine Kette von Folgereaktionen aus, die als sekundäre biologische Wirkung der Strahlung erfaßt wird.

Durch Bestrahlung muß, den Gesetzen der Wahrscheinlichkeit entsprechend, mit zunehmender Bestrahlungszeit (Dosis) die Zahl der Treffer ansteigen.
Daraus resultiert ein Anstieg der sekundären biologischen Wirkung.

Ein Anstieg der Treffer im Primärbereich bedeutet dabei einen Anstieg der Teilungsverzögerung (N/N_o) oder anders ausgedrückt eine Abnahme im Teilungsvermögen der bestrahlten Tiere (N).

Nach der "formalen Treffertheorie" ist diese Abnahme proportional der bei einer bestimmten Dosis (D) vorhandenen Abnahme (N) und einer Einstrahlungskonstanten (b), die von der Art der Strahlung abhängig ist.
Die Bedingungen für (b) sind in dieser Arbeit UV, 254 nm, Dosisleistung: 20 ergs/mm^2 x sec .

Diese Proportionalität läßt sich nach GLASER (1969) als Differentialgleichung ausdrücken :

$$\frac{dN}{dD} = - bN$$

Diese Gleichung läßt sich für die Bedingungen ($N = N_o$; $t = 0$) formal lösen und führt zu :

$$N = N_o e^{-bD} \quad ; \text{ bzw. } \frac{N}{N_o} = e^{-bD} \quad .$$

Diese bisher theoretische Ableitung der formalen Trefftertheorie zeigt aber eine klare Übereinstimmung (über 98%) mit dem in Experiment (3.1.1.) gefundenen Kurvenverlauf :

$$\frac{N}{N_o} = e^{-0.16\ D} \qquad \text{(für unsynchrone Tiere)}$$

Auf diese Weise ist die Einstrahlungskonstante der formalen Trefftertheorie bestimmt :

$$b = 0.16 \qquad \text{(für unsynchrone Tiere)}$$

Die Werte für S - Phase und G_1- Phase sind bereits in (3.1.1.) angegeben. Auf die unterschiedliche Empfindlichkeit gehe ich in der Diskussion zur DNA - Replikation ein.

Die hier gemachten Betrachtungen gelten nur unter zwei Bedingungen :

- die Schutzwirkung des Nährmediums gegen UV wurde mit 50/ul extrem klein gehalten,
- alle Ergebnisse treffen nur für einen Betrachtungszeitraum von 48 h nach Bestrahlung zu. Die danach gemessenen Teilungsverzögerungen werden denen unbestrahlter Tiere immer ähnlicher. Dies ist nur auf eine Erholung der bestrahlten Tiere zurückzuführen.

Bei einer Dosis von 6 kergs/mm^2 sind diese Erholungs-

prozesse im Zeitraum von 48 - 72 h nach Bestrahlung abgeschlossen.
Für den Dosisbereich bis 12 kergs/mm^2 gilt : Die in der G_1- Phase bestrahlten Tiere nehmen in diesem Zeitraum die Vermehrungsrate der unbestrahlten Tiere an. Wurden die Tiere in der S-Phase bestrahlt, so verhalten sie sich, sofern sie überleben, wie die G_1 - Tiere.

Da Leichen auftraten, war das Erholungsvermögen unter den obigen Bedingungen im Bereich zwischen 6 und 12 kers/mm^2 an seiner Grenze angelangt.

Aus der unterschiedlichen Empfindlichkeit ergibt sich das Problem :

- ist der primäre Trefferbereich der G_1 - Phase von anderer Natur als der primäre Trefferbereich der S - Phase oder
- ist der primäre Trefferbereich nur unempfindlicher als der der S - Phase.

Außer der in vivo Dimerisierung (s.u.) spricht für die zweite Annahme, daß der Empfindlichkeitsunterschied zwischen S und G_1-Phase bei kleinen Dosen nicht auftritt. Wären die Trefferbereiche von völlig verschiedener Natur, so wären auch hier Unterschiede wahrscheinlich.

Als Primäreffekt der Strahlenwirkung des UV - Lichtes im 254 nm Bereich kommt es offenbar zu einer Wechselwirkung zwischen eingestrahltem Energiequant und DNA, die zu einer Dimerisierung zweier auf einem Strang benachbarter Thyminmoleküle führt und nicht zu Strangbrüchen in der DNA (3.1.4.).

Diese Thyminmoleküle bilden Dimere vom Cyclobutantyp, die für die meisten biologischen Veränderungen nach UV - Bestrahlung verantwortlich gemacht werden (WACKER, 1962; CLEAVER, 1970; TROSKO, 1970).

Der Vergleich der in vivo Dimerisierung von Stylonychia mit anderen Organismen ist schwierig. Beobachtungen der in vivo Dimerisierung über einen weiten Dosisbereich liegen für Eukaryonten kaum vor.

Am besten kann man die Stylonychia Versuche mit denen von WACKER beschriebenen vergleichen.

Bei WACKER (1962) liegen die Dimerisierungswerte der in vivo bestrahlten Enterococcus Bakterien über denen bei Stylonychia gefunden . Die Bestrahlungsparameter und die Höhe des Nährmediums (2 mm) waren in beiden Versuchen gleich. (2.2.6.1.)

Die von WACKER (1960) ermittelten Werte zeigen, daß die maximale Dimersättigung bei in vivo Bestrahlung bei Enterococcus bei 16% Dimere liegt (bei 70 kergs/mm^2 und mehr). Bei Stylonychia liegt unter diesen Bedingungen die Dimersättigung bei 9%. Vergleicht man die Werte in dem Dosisbereich, der für Stylonychia interessant ist, so ergibt sich :

Dosis kergs/mm^2	Dimerrate Enterococcus	Dimerrate Stylonychia
36	14.5%	5.7%
48	15.4%	7.3%
72	16.2%	7.7%
84	16.5%	8.7%

Bei in vivo Bestrahlung werden in der Enterococcus - DNA 40 - 50 % mehr Dimere gebildet, als bei Stylonychia.

Da Enterococcus einen Anteil von (A + T) = 60% (WACKER, 1960) hat, im Gegensatz zu Stylonychia (A + T) = 70% (AMMERMANN et al., 1974), kann man die höhere Dimerisierung nicht auf den (A + T)-Anteil zurückführen.

Mir erscheint es plausibler, die niedrigere in vivo Dimerisierung von Stylonychia durch eine Schutzwir-

kung der Kernproteine zu interpretieren.

Dies wird bestätigt durch die Versuche der in vitro Bestrahlung. Dabei zeigen Abb.: 13 und (3.1.5.2.) die Verhältnisse nach Bestrahlung isolierter DNA. Hier treten nach in vitro Bestrahlung etwa vierfach höhere Dimerisierungswerte auf als nach in vivo Bestrahlung.

Ist die in vivo Dimerisierung mit der Überlebensrate oder mit der Teilungsverzögerung korreliert ?

In Abb.: 28 (oben) ist neben der in vivo - Dimerisierung von Stylonychia auch die Überlebensrate als Quotient der abgetöteten Zellen (N) und der Zellzahl vor Bestrahlung (N_o) aufgetragen.
Da dieses Absterben durch Platzen der Zellmembranen geschieht, ist ein Zusammenhang mit der Dimerisierung unwahrscheinlich.
Bei 84 kergs/mm^2 lysieren alle Zellen. Sie enthalten in ihren Kernen 9 % TT - Dimere. Bei der 10 %-igen Todesrate (48 kergs/mm^2) sind 7 % TT - Dimere vorhanden. Da eine Zunahme von 2 % an Dimeren zu einer 90 %-igen Veränderung der Überlebensrate führt deutet das darauf hin, daß hier keine Korrelation vorliegt. Schließlich zeigen 5.7 % Dimere (bei 36 kergs/mm^2) keinen Einfluß auf die Überlebensrate.
Ich vermute daher eine direkte Strahlenschädigung der Membranproteine oder des Plasmas.

In Abb.: 29 ist die Dimerisierung gegen die Teilungsverzögerung aufgetragen. Hier ist ersichtlich, daß die Zunahme der Teilungsverzögerung genau in den Dosisbereich fällt, in dem die Dimerisierung ansteigt.

Wegen der Schutzwirkung des Nährmediums tritt unterhalb von 20 kergs/mm^2 keine Teilungsverzögerung auf. Zwischen 20 kergs/mm^2 und 70 kergs/mm^2 verhalten sich Teilungsverzögerung und Dimerrate praktisch umgekehrt proportional. Dabei fällt eine 50%-ige Teilungsverzögerung in einen Dosisbereich von 40 kergs/mm^2 und mit 6 % Dimeren zusammen.

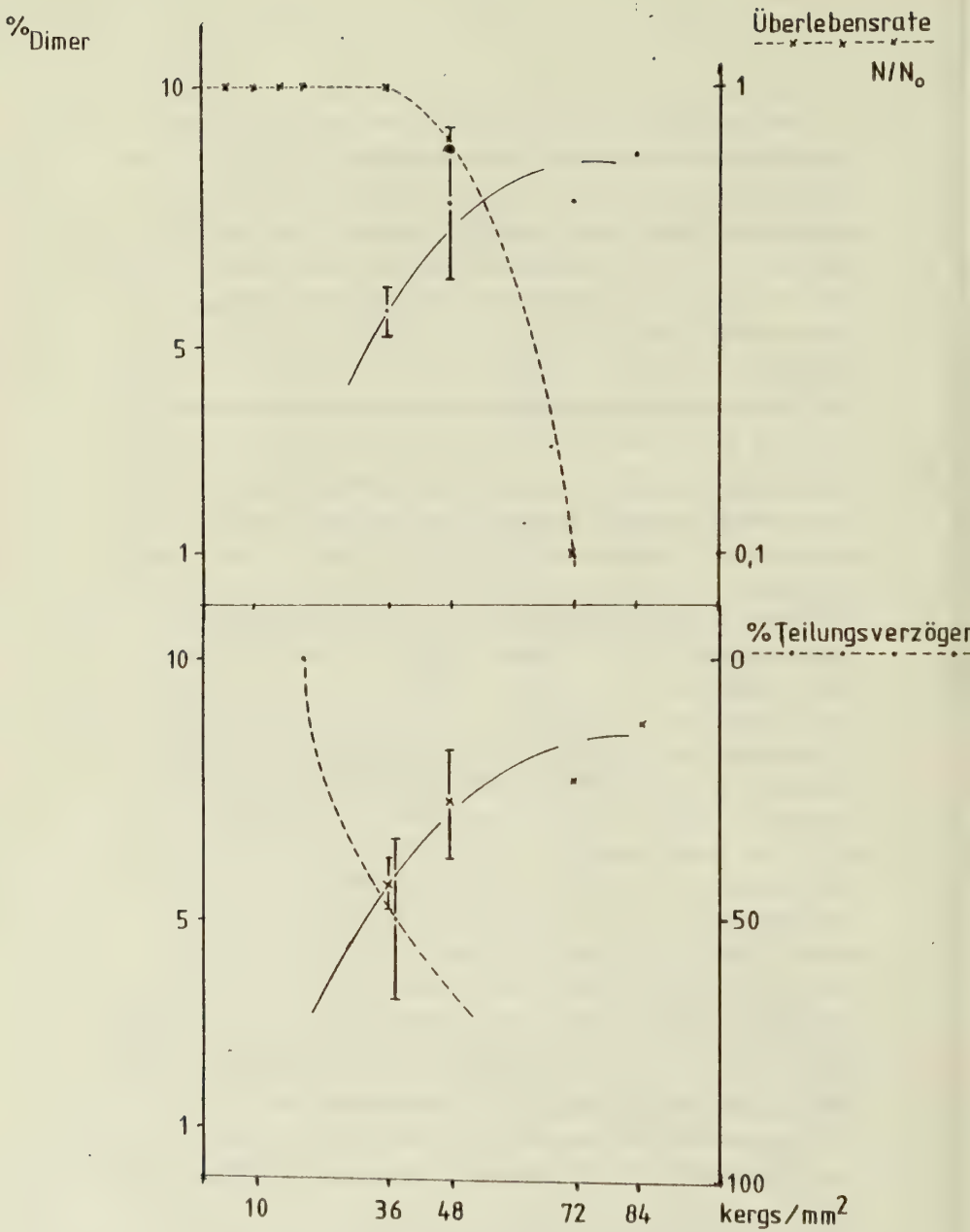


Abb.: 28 (oben) Zusammenhang zwischen Dimerisierungsrate und Überlebensrate.

Abb.: 29 (unten) Zusammenhang zwischen Dimerisierungsrate und Teilungsverzögerung

Nach in vivo Bestrahlung mit einer Dosis von 48 kergs/mm^2 treten sofort nach Bestrahlung 7% TT - Dimere auf (Abb.:10). Wurde die DNA 24 h nach Bestrahlung isoliert, so ließen sich keine Dimere mehr nachweisen (Abb.: 9).

Da Postreplikationsreparatur wegen der Coffeinresistenz wahrscheinlich keine wichtige Rolle spielt, verbleibt nur die Excisionsreparatur. Zwar wurde für Stylonychia die Excisionsreparatur nur nach Röntgenbestrahlung eindeutig nachgewiesen, aber da nach heutigem Wissensstand Excisionsreparatur Schäden beider Strahlenarten repariert (KÖRNER, 1976), liegt es nahe, auch nach UV - Bestrahlung Excisionsreparatur an den Dimeren anzunehmen. Da in den Autoradiographien nach UV keine atypische DNA - Synthese auftrat, kann man folgern, daß die durch die Reparaturvorgänge gebildete Stranglücke sehr klein ist.

Das stimmt mit einigen an Eukaryonten gemachten Beobachtungen überein. So wird bei HeLa - Zellen nach UV - Bestrahlung nur 1.7% der DNA abgebaut und anschließend neusynthetisiert (CLEAVER, 1968). Zum Vergleich wurde nach HOWARD - FLANDERS (1966) bei Escherichia coli nach UV _ Bestrahlung bis zu 50% der DNA neusynthetisiert. Nach SMETS (1966) werden bei Mammalia nur die einzelnen durch UV geschädigten Nukleotide ausgewechselt.

In Abb.: 30 sind die in vitro Dimerisierungsraten von Stylonychia, Enterococcus und Escherichia coli dargestellt. Sie wurden dabei in Beziehung gesetzt zum (A + T)-Gehalt des Organismus :

Organismus	(A + T)%	Dimer (%) gefunden	Dimer (%) theoretisch
Escherichia coli, WACKER 1962	50	10	13
Enterococcus WACKER, 1960	60	16	18
Stylonychia	70[+]	30	25

[+]) AMMERMANN et al., 1974

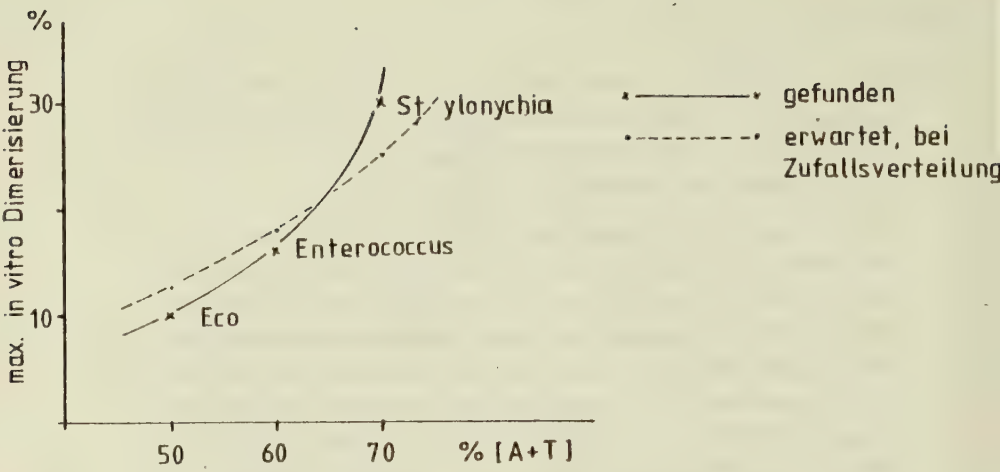


Abb.: 30 Verhältnis zwischen maximaler in vitro - Dimerisierung und (A + T) - Gehalt des Organismus. (Eco = Escherichia coli)
——— gefunden
------ erwartet, bei Zufallsverteilung der Thyminmoleküle in der DNA.

Die theoretische Wahrscheinlichkeit für die entstehenden Dimere auf der DNA wurde für eine zufällige Verteilung des Thymins in der DNA errechnet. Sie ist

$$2 \left(\frac{(A+T)\,\%}{2} \times \frac{(A+T)\,\%}{2} \right)$$

Zunächst scheint der Stylonychia Wert mit 30% gefundenen Dimeren zu hoch zu sein. Eine solche Dimerisierung ist nur dann zu erklären, wenn in der DNA (A + T)-reiche Abschnitte vorliegen. (MURTI et al., 1972) Bei Tetrahymena wurden ähnliche Befunde gemacht.

So trennte BRUNK (1973) Tetrahymena DNA in verschieden pyrimidinreiche Abschnitte und verglich nach UV - Bestrahlung deren Dimerisierung. Dabei ergab sich für die pyrimidinarmen DNA - Fraktionen eine Dimerisierung von 10%, für die pyrimidinreichen über 30%.
(Die Werte gelten jeweils für 40 kergs/mm^2). Auch bei

niedrigen UV - Dosen findet sich zwischen Tetrahymena (BRUNK, 1973) und Stylonychia Übereinstimmung :

Dosis kergs/mm^2	Tetrahymena BRUNK,1973	Stylonychia
8	4.5% Dimere	
6		7.5% Dimere

Durch die Dimerisierungsraten, die mit Acetophenon - DNA gefunden wurden, kann das Vorhandensein von (A + T)-reichen Abschnitten unterstrichen werden. Stellt man die maximale Dimerisierung von Acetophenon-DNA der theoretischen Wahrscheinlichkeit (bei zufälliger Thymin - Verteilung) gegenüber, so ergibt sich :

	Stylonychia	Tetrahymena BRUNK, 1973	Escherichia coli LAMOLA, 1967
Dimere in Acetophenon-DNA:	48 %	53 %	37 %
Theoretische Wahrscheinlichkeit :	25 %	25 %	12 %

Hier sieht man, daß bei Stylonychia in vivo etwa 18 % der möglichen Dimere gebildet werden (Schutzwirkung der Kernproteine). Bei in vitro Bestrahlung treten bei Stylonychia immerhin 63 % der Acetophenon-Dimerrate auf.

Auch bei Acetophenon - DNA ist die Bildungsrate mit dem (A + T)-Gehalt der DNA korreliert. Während bei Stylonychia und Tetrahymena mit gleichem (A + T)-Gehalt auch die Dimerisierung sehr ähnlich ist, liegt die maximale Dimerisierung bei Escherichia coli (mit (A+T)=50%) bei nur 37 %.

In 3.1.1. wurde festgestellt, daß bei UV - Bestrahlung die S - Phase sensibler reagiert als die G_1- Phase. Deshalb wurde in Versuch 3.1.6. untersucht, ob die DNA - Replikation durch Bestrahlung beeinflußt wird.

Bei geringen Strahlendosen liegt kein Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Tieren vor. Bei einer Dosis von 12 kergs/mm^2 wird der Einbau von ^{3}H - TdR in die DNA signifikant herabgesetzt.

Bestrahlt man ein Tier in der S - Phase, so liegt ein Teil der DNA nicht als Doppelstrang vor. WACKER (1962) konnte zeigen, daß Einzelstrang - DNA wesentlich stärker dimerisiert als Doppelstrang - DNA, wie sie in der G_1 - Phase vorliegt.
Die Dimere, die in den Replikonabschnitten entstehen, werden entweder repariert bevor die Replikation fortschreitet oder die Replikation geht sofort weiter. Dies führt aber zu einer Stranglücke, die nur durch Postreplikationsreparatur aufgefüllt werden kann. Postreplikationsreparatur liegt jedoch bei Stylonychia offenbar nicht vor.

Nach dieser Interpretation wäre die erhöhte Empfindlichkeit der S - Phase nicht die Folge eines zur G_1 - Phase unterschiedlichen Trefferbereiches, sondern der Unterschied läge nur in der DNA - Empfindlichkeit.

4.2. Röntgenbestrahlung.

Stylonychia mytilus ist im Vergleich zu anderen Tieren extrem unempfindlich gegenüber Röntgenstrahlung. So sterben bei Amoeba, einer im Vergleich zu anderen Eukaryonten sehr unempfindlichen Gattung, nach einer Bestrahlung mit 100 kR 50 % der Tiere ab (STREFFER, 1969).
Bei Paramaecium caudatum sterben bei 35 kR 50% der Tiere (GLASER, 1971), während bei Stylonychia mytilus - Ami 100% eine Dosis von 330 kR überleben.

Ein wichtiger Grund dafür ist, daß diese Tiere keinen Mikronukleus mehr besitzen. Wurden mikronukleushaltige Stämme bestrahlt, so führte das bei einer Dosis von 330 kR zunächst zu Mißbildungen und bei den Überlebenden immer zum Verlust des Mikronukleus (AMMERMANN, 1970).

Warum ist der Makronukleus strahlenresistenter als der Mikronukleus ?
Man könnte daran denken, daß die Strahlenresistenz mit dem hohen DNA - Gehalt des Makronukleus in Verbindung steht. Nach AMMERMANN (1971, 1974) liegen die Gene, die für die somatischen Funktionen des Kernes relevant sind, im Makronukleus in vielen Kopien vor. Durch Strahlenschädigung eines dieser Gene würden dann noch eine Vielzahl intakter Kopien vorliegen.

Allerdings konnte eine Korrelation zwischen Strahlenresistenz und Ploidiegrad des Makronukleus bei Tetrahymena pyriformis nicht gefunden werden. (WELLS, 1960).

Wichtiger als der DNA - Gehalt des Makronukleus scheint die Organisationsform der DNA im Kern zu sein.
So gilt nach den grundlegenden Arbeiten von HUTCHINSON (1961), daß Moleküle mit niedrigem Molekulargewicht unempfindlicher gegen Röntgenstrahlen sind als solche mit hohem Molekulargewicht.

Die DNA des Makronukleus hat Molekulargewichte zwischen 0.3 - 14 x 10^6 Dalton (häufigstes Auftreten : 10^6 - 3 x 10^6 Dalton) (LIPPS & STEINBRÜCK, 1978).
Das Molekulargewicht der DNA des Mikronukleus liegt mit 8.3 x 10^7 Dalton (AMMERMANN et al., 1974) weit über diesen Werten.

Neben der DNA - Länge besteht auch zwischen der Chromosomenlänge und der Resistenz gegen Röntgenstrahlen ein direkter Zusammenhang.
Dies wurde in den Arbeiten von GODWARD (1960, 1966) dargestellt. Hier eine Zusammenstellung :

Alge	Überlebensdosis (R)	Chromosomenlänge (µm)
Chaetomorpha Cladophorales	5 x 10^4	1.2 - 1.4
Mougeotia Conjugales	5 x 10^4	0.2 - 1.0
Zygnema Conjugales	7 x 10^4	0.3 x 0.7
Eudorina Volvocales	10^5	0.4 - 0.7
Chlorella Chlorococcales	2 x 10^6	nicht auflösbar

Die Daten von Stylonychia mytilus passen sehr gut in dieses Schema. Die Metaphase - Chromosomen des Mikronukleus von Stylonychia mytilus haben eine Länge von 2 - 9 /um (AMMERMANN, 1965).
In den Makronuklei der Ami - Stämme wurden dagegen im Lichtmikroskop noch nie Chromosomen gefunden.

Die Ergebnisse der Doppelstrangbrüche (3.2.6.1.) in isolierten Mikro- und Makronuklei zeigen, daß bei einer Bestrahlung mit 5 x 10^5 R die Schädigungen der Mikronukleus - DNA wesentlich stärker waren.

Auch bei der in vivo Bestrahlung mit 80 000 R (3.2.5.2.) (Abb.: 23) wird die hochmolekulare Mikronukleus - DNA ganz erheblich durch Einzelstrangbrüche abgebaut. Doch ist es vorstellbar, daß auch nach Bestrahlung in der hochmolekularen Fraktion noch genügend DNA ist, um bei einer Excisionsreparatur als Matrize dienen zu können.

Es ist schlecht vorstellbar, daß die in 3.2.4. für den Makronukleus nachgewiesene Excisionsreparatur nur im Makronukleus und nicht im Mikronukleus abläuft.

Für die in Abb.: 16 dargestellte Dosis-Effekt Kurve gelten ebenfalls die in der Diskussion zu den UV-Versuchen dargestellten Prinzipien :

- Es muß ein neuralgisches Molekül vorliegen. Hier wird die DNA darauf hin untersucht = Primärbereich.
- Durch Schädigung dieses Primärbereiches muß eine sekundäre biologische Wirkung auftreten. Hier wurde der LD_{50}- Wert herangezogen.

Abb.: 16 zeigt zwischen eingestrahlter Dosis und LD_{50}- - Wert dieselbe logarithmische Korrelation, wie sie für solche Kurven gefordert wird.

In der Einleitung wurde schon erwähnt, daß bei Eukaryonten drei Reparatursysteme vorliegen :

- Excisionsreparatur zur Reparatur von Basenschäden und Wiedervereinigung von Einzelstrangbrüchen

- ein noch völlig unbekanntes Reparatursystem, das DNA - Doppelstrangbrüche restauriert.

- die Postreplikationsreparatur.

Die Postreplikationsreparatur ist besonders bei den Rodentia wirksam, bei denen die Excisionsreparatur nur schwach oder gar nicht ausgebildet ist (KÖRNER, 1976). Dabei entsteht bei der S-Phasen Replikation in dem DNA - - Bereich, der der Schadstelle gegenüber liegt, eine Stranglücke. Diese Stranglücken werden erst nach vollzogener Replikation der DNA aufgefüllt. Dieser Einbau von Nukleotiden in die Stranglücke ist in Gegenwart von Coffein nicht möglich. (HAUGLI, 1972 ; LEHMANN, 1972 a; LETT & ADLER, 1978).
Da in Versuch 3.2.3. Coffein der "Grenzkonzentration" weder einen Einfluß auf unbestrahlte noch auf bestrahlte Zellen hat, ist diese Reparatur bei Stylonychia wahrscheinlich nur von geringer Bedeutung oder gar auszuschließen.

Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen ist jetzt auch für Säugetiere nachgewiesen (KÖRNER, 1976). Außer einigen Arbeitshypothesen liegt über die Art der Reparatur nichts vor. (HOWARD - FLANDERS, 1973).
DUBININ (1964) wies darauf hin, daß nach vollzogenem Doppelstrangbruch die beiden DNA - Stücke nicht dissozieren, sondern durch ihre Nukleoproteine in räumlicher Verbindung bleiben. Ob ein solches Nukleoproteingerüst für die Reparatur eine Rolle spielt ist unbekannt.
Wie in den Agarose - Gelen (3.2.6.2. und Abb.: 25) gezeigt wurde, wird die gesamte niedermolekulare Fraktion der Makronukleus DNA 24 h nach Bestrahlung durch Wiedervereinigung der Doppelstrangbrüche rekonstituiert.
Aus den UMSP - Messungen (3.2.9.) geht eindeutig hervor, daß sich die Gesamtmenge der DNA pro Kern auch durch Bestrahlung nicht ändert. Damit sind alle Hypothesen, die ein Ausschleusen zerstörter DNA aus dem Kern in Erwägung ziehen hinfällig.

Die Wiedervereinigung von Einzelstrangbrüchen und die Excisionsreparatur von Basenschäden werden heute als ein Mechanismus angesehen (KÖRNER, 1976).
Der Unterschied beruht nur darauf, daß bei der eigentlichen Excision durch die Endonuklease I erst die geschädigte Base mit den anderen Nukleotiden herausgeschnitten wird, während beim Einzelstrangbruch diese Lücke bereits besteht. Der weitere Reparaturablauf ist derselbe.
Die beschriebene Wiedervereinigung der Einzelstrangbrüche (3.2.5.1.) in den Makronuklei läßt sich daher auf die in (3.2.4.) nachgewiesene Excisionsreparatur mit ihrer atypischen (unscheduled) DNA - Synthese zurückführen.

Die Polyacrylamidgel - Methode (3.3.7.) zeigt, daß 12 h nach Bestrahlung noch nicht alle Strangbrüche repariert sind.
Die Angaben über die Dauer solcher Excisionsreparaturen schwanken von wenigen Minuten (Escherichia coli, HOWARD - FLANDERS, 1973) über eine Stunde (Xeroderma pigmentosum Fibroblasten, KLEIJER & LOHMANN, 1970) bis 20 h (Mammalia, CLEAVER & TROSCO, 1969). Stylonychia mytilus liegt innerhalb dieser Spannbreite.

Für das in Polyacrylamid-Gelen gehäufte Auftreten von Brüchen, die etwa 140 - 200 Basenpaare auseinanderliegen, möchte ich noch eine Hypothese aufstellen.
LIPPS & MORRIS (1977) erhielten nach Verdauung mit Micrococcus Nuklease eine Länge im Nukleosomenrepeat von Stylonychia (Makronukleus) von 140 Basenpaaren. Wenn man sich vorstellt, daß die DNA durch die Röntgenstrahlung bevorzugt im Intercorebereich geschädigt wird, würde dies nach DNA - Präparation die Anreicherung von DNA - Strängen mit 140 - 200 Basenpaaren erklären.
Diese Anreicherung von Repeats und deren Vielfachen konnten SKALKA et al. (1976) zum ersten Mal zeigen, indem sie aus röntgenbestrahlten Lymphocyten die DNA auf Polyacrylamidgelen auftrennten.

5. Zusammenfassung.

Wirkung von UV - Strahlen.

Stylonychia mytilus reagiert auf UV - Bestrahlung während der S - Phase sensibler (22%) als während der G_1- Phase.

Die DNA - Replikation ist signifikant verzögert.

Bei unsynchronisierten Tieren ist eine Verminderung der Teilungsrate um 50% bei einer Dosis von 4 kergs/mm^2 zu beobachten.

Als einzige Wirkung der UV - Strahlen auf die DNA der Makronuklei ließ sich eine Dimerisierung nachweisen. Der Prozentsatz steigt mit der Dosis der Strahlung und erreicht bei 84 kergs/mm^2 einen Höchstwert von 8.8 %, wenn lebende Tiere bestrahlt wurden.

Bei Bestrahlung isolierter DNA lassen sich hingegen maximal 30 % Dimere (bei 84 kergs/mm^2) erreichen. Bei Bestrahlung isolierter DNA in Gegenwart von Acetophenon steigt dieser Wert sogar auf 48 % Dimere an.

Daraus muß geschlossen werden, daß bei Stylonychia AT - reiche Regionen der DNA des Makronukleus vorliegen.

Röntgenstrahlen.

Röntgenstrahlen wirken auf Kerne in der G_1- und S - Phase gleich.
Eine Verzögerung der DNA - Replikation tritt nur 6 h nach Bestrahlung auf.

Die DNA der Makro- und Mikronuklei erleiden durch Röntgenstrahlen Einzel- und Doppelstrangbrüche, wobei die (höhermolekulare) Mikronukleus - DNA stärker geschädigt wird.

Reparatur der Strahlenschaden.

UV - Strahlen.
Die durch die UV - Strahlung gebildeten Dimere der Makronukleus - DNA werden durch Excisionsreparatur wieder beseitigt. Da die Autoradiographien keine

atypische DNA - Synthese erkennen lassen, werden vermutlich nur die Dimere sowie allenfalls wenige benachbarte Nukleotide herausgeschnitten und neusynthetisiert. Die Reparatur ist innerhalb von 24 Stunden abgeschlossen.

Röntgen - Strahlen.

Die durch die Röntgenstrahlen gebildeten Einzelstrangbrüche der Makronukleus DNA werden innerhalb 12 - 30 Stunden wahrscheinlich mittels Excisionsreparatur repariert. Die Reparatur ist in den Autoradiographien als eine von der normalen S - Phase unabhängigen DNA - Synthese des Makronukleus nachweisbar.

Die Doppelstrangbrüche der Makronukleus - DNA werden ebenfalls im Zeitraum von 24 Stunden repariert. Postreplikationsreparatur konnte für Stylonychia mytilus nicht nachgewiesen werden.

6. Literaturverzeichnis.

ALEXANDER, P; BACQ, Z.M. (1961): The Nature of the Initial Radiation Damage at the Subcellular Level. - In: HARRIS, R.J.C.: The Initial Effects of Ionizing Radiation on Cells. - London, New York, 1961. -

AMMERMANN, D. (1965): Cytologische und genetische Untersuchungen an dem Ciliaten Stylonychia mytilus EHRENBERG. - Arch. Protistenkunde, 108, 109 - 152. -

AMMERMANN, D. (1970): The Micronucleus of the Ciliate Stylonychia mytilus, its Nucleic Acid Synthesis and its Function. - Exp. Cell Res., 61, 6 - 12. -

AMMERMANN, D. (1971): Morphology and Development of the Macronucleus of the Ciliates Stylonychia mytilus and Euplotes aediculatus. - Chromosoma (Berl.), 33, 209 - 238. -

AMMERMANN, D.; STEINBRÜCK, G.; BERGER, L.v.; HENNIG, W. (1974): The Development of the Macronucleus of the Ciliated Protozoan Stylonychia mytilus. - Chromosoma (Berl.), 45, 401 - 429. -

BACQ, Z.M.; ALEXANDER, P. (1958): Grundlagen der Strahlenbiologie. - Stuttgart, 1958. -

BACQ, Z.M.; ALEXANDER, P. (1961): Mechanisms of Chemical Radiation Protection. - In: HARRIS, R.J.C.: The Initial Effects of Ionizing Radiation on Cells, - London New York, 1961. -

BEERS, R.F. (1972): Molecular and Cellular Repair Processes. - John Hopkins Univ. Press, 1972. -

BLUMENFELD, L.A.; KALMANSON, A.E. (1961): Electron Spin Resonance (ESR) Investigations on Radiation - Induced Chemical Effects. - In HARRIS, R.J.C.: The Initial Effects of Ionizing Radiations on Cells. - London, New York. 1961. -

BÖHME, H.; ADLER, B. (1970): Reparatur von DNS Schäden. - Wissenschaft und Fortschritt, 20, 98 - 103. -

BRUNK, C.F. (1973): Distribution of Dimers in Ultraviolet - Irradiated DNA. - Nature New Biol., 241, 74 - 76. -

CALKINS, J. (1968): The Variation of Radiation Sensitivity of Bacteria Fed Tetrahymena pyriformis during the Growth Cycle and Factors related to its Origin. - Photochem. Photobiol., 8, 115 - 129. -

CHANDRA, P.; APPEL, W. (1973): Methoden der Molekularbiologie. -
C. Fischer Verlag, Stuttgart. 1973. -

CLEAVER, J.E. (1968) : Repair Replikation and Degradation of Bromuracil - Substituted DNA in Mammalian Cells after Irradiation with Ultraviolet Light. -
Biophys. Jour., 8, 775 - 791. -

CLEAVER, J.E.; TPOSKO, J.E. (1969): DNA - Degredation Products from Mammalian Cells Irradiated with UV - Light. -
Int. J. Radiat. Biol., 15, 411 - 424. -

CLEAVER, J.E. (1970) : Absence of Excision of UV - Induced Cyclobutane Dimers in Xeroderma pigmentosum. -
Photochem. Photobiol., 11, 547 - 550. -

DOCUMENTA GEIGY (1969) : Wissenschaftliche Tabellen. -
7. Auflage. -
Basel, 1969. -

DUBININ, N.P. (1964) : Problems of Radiation Genetics. -
Edinburgh, London. 1964. -

DUBININ, N.P. (1965) : Molekulargenetik. -
Jena, 1965. -

ELFORD, H.L. (1968) : Effects of Hydroxyurea on Ribonucleotide Reductase. -
Biochem. Biophys. Res. Comm., 33, 129 - 134. -

ELLIOTT, A.M.; BROWNELL, L.E.; GROSS, I.A. (1954) :
Use of Tetrahymena to Evaluate the Effects of Gamma Radiation on Essential Nutrilites. -
J. Protozool., 1, 193 - 199. -

ESCHKE, W.; SIEGEL, G. (1962) : Probleme und Ergebnisse aus Biophysik und Strahlenbiologie III. -
Berlin. 1962. -

EVANS, H.J. (1962) : Chromosoms Abberations Induced by Ionizing Radiation. -
New York. 1962. -

FASSKE, E.; THEMANN, H. (1963) : Strahlenwirkungen auf Einzelformationen der Zelle. -
In SCHERER, E.; STENDER, H.S. (1963) : Strahlenpathologie der Zelle. -
Stuttgart. 1963. -

GLASER, R. (1971) : Einführung in die Biophysik. -
Fischer (Jena), 1971. -

GODWARD, M.B.E. (1960) : Resistance of Algae to Radiation. -
Nature, 185, 706. -

GODWARD, M.B.E. (1966) : The Chromosomes of the Algae. - London. 1966. -

GOLDMANN, K.; FRIEDBERG, E.C. (1972) : Measurement of Thymin - Dimers in DNA by Thin - Layer Chromatography. - Analytical Biochem., 53, 124 - 131. -

HAUGLI, F.B.; DOVE, W,F. (1972) : Mutagenesis and Mutant Selection in Physarum polycephalum. - Molec. and Gen. Genetics, 118, 109 - 124. -

HENNIG, W.; HENNIG, I.; STEIN, H. (1970) : Repeated Sequences in the DNA of Drosophila and their Localisation in Giant Chromosomes. - Chromosoma (Berl.), 32, 31 - 63. -

HEWLETT PACKARD (1978) : Curve Fitting Programm HP - 97. - Böblingen. 1978. -

HOWARD - FLANDERS, P. (1966a) : Mutants of Escherichia coli K - 12 Defective in DNA Repair and in Genetic Recombination. - Genetics, 53, 1137 - 1150. -

HOWARD - FLANDERS, P.; BOYCE, P.R.; THERIOTT, C. (1966b) : Three Loci in Escherichia coli K - 12 that Control the Excision of Pyrimidin Dimers and certain other Mutagen Products from DNA. - Genetics, 53, 1119 - 1136. -

HOWARD - FLANDERS, P. (1973) : DNA - Repair and Recombination. - British Medical Bulletin, 29, 226 - 235. -

HUTCHINSON, F. (1961) : Molecular Basis for Action of Ionizing Radiations. - Science, 134, 533. -

KLEIJER, W.J.; LOHMANN, P.M.M. (1970) : Repair of X-ray Damage of Cultivated Cells from Patients Having Xeroderma pigmentosum. - Mutation Res., 9, 517 - 523. -

KÖRNER, I.; MALZ, W.; PITRA, C. (1976) : Dark Repair Processes in Mammalian Cells. - Biol., Zbl., 95, 561 - 577.-

KRAEMER, K.H.; COON, H.G. et al. (1975) : Genetic Heterogenity in Xeroderma pigmentosum: Complementation Groups and their Relationship to DNA Repair Rates. - Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 59 - 63. -

LAMOLA, A.A. (1966) : Molecular Mechanism in Nucleic Acid Photochemistry. - J. Americ. Chem. Soc., 88, 813 - 819.. -

LAMOLA, A.A.; YAMANE, T. (1967) : Sensitized Photodimerisation of Thymine in DNA. -
Proc. Nat. Acad. Sci., 58, 443 - 446. -

LEHMANN, A.R. (1972) : Effects of Caffeine on DNA Synthesis in Mammalian Cells. -
Biophys. Jour., 12, 1316 - 1325. -

LEHMANN, A.R.; KIRK - BELL, S. et al. (1975) : Xeroderma pigmentosum Cells with Normal Levels of Excision Repair have a Defect in DNA Synthesis after UV - Irradiation. -
Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 219 - 223. -

LETT, J.T.; ADLER, H. (1978) : Advances in Radiation Biology. Vol. 7. -
New York. 1978. -

LIPPS, H.J.; MORRIS, N.R. (1977) : Chromatin Structure in the Nuclei of the Ciliate Stylonychia mytilus. -
Biochem. Biophys. Res. Comm., 74, 230 - 234. -

LIPPS, H.J.; STEINBRÜCK, G. (1978) : Free Genes for rRNAs in the Macronuclear Genome of the Ciliate Stylonychia mytilus. -
Chromosoma (Berl.), in press. -

LOENING, U.E. (1968) : The Fractionation of High Molecular Weight RNA. -
In: SMITH, I. (1968): Chromatographic and Electrophoretic Techniques 2.
Medical Books, 1968. -

METZGER, K. (1964) : On the Dark Reaktivation Mechanism in Ultraviolet Irradiated Bacteria. -
Biochem. Biophys. Res. Comm., 15, 101 - 109. -

MURTI, K.G.; PRESCOTT, D.M.; PENE, J.J. (1972): DNA of Ciliate Protozoa. Binding of Polymerase and Denaturation at the Ends of the Low-molecular Weight DNA in Stylonychia. -
J. Molec. Biol., 68, 413 - 416. -

SCHERER, E; STENDER, H.S. (1963) : Strahlenpathologie der Zelle. -
Stuttgart. 1963. -

SETLOW, R.B.; CARRIER, W.L. (1966) : Pyrimidine Dimers in Ultraviolet Irradiated DNA's. -
J. Mol. Biol., 17, 237 - 254. -

SMETS, L.A. (1966) : Radiation Induced Inhibition of Thymidine Incorporation by Mammalian Cells in vitro.
Nature, 211, 527 - 528. -

STONE, M.; PRESCOTT, D.M. (1965) : ^{3}H-Thymidine Derivate Pools in Relation to Macronuclear DNA Synthesis in Tetrahymena pyriformis. -
J. of Cell Biol., 25, 171 - 177. -

SUTHERLAND, B; RICE, M.; WAGNER, E.K. (1975) : Xeroderma pigmentosum Cells Contain Low Levels of Photo-reactivating Enzyme. -
Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 103 - 107. -

TOMURA, T.; LANCKER, J.C. (1975) : The Effect of a Mammalian Repair Endonuclease on X-Irradiated DNA. -
Biochimica et Biophysica Acta, 402, 343 - 350.-

WACKER, A.; DELLWEG, H.; WEINBLUM, D. (1960) : Strahlen-chemische Veränderungen der Bakterien Desoxy-ribonukleinsäure in vivo. -
Naturwissenschaften, 20, 477. -

WACKER, A.; DELLWEG, H.; JACHERTS, D. (1962) : Thymin Dimerisierung und Überlebensrate bei Bakterien. -
J. Mol. Biol., 4, 410 - 412. -

WACKER, A. (1963) : Molecular Mechanisms of Radiation Effects. -
Progress in Nucl. Acid Res., 1, 369 - 399. -

WANG, S.Y; PATRICK, M.H.; VARGHESE, A.J. (1967) : Concerning the Mechanism of Formation of UV - Induced Thymine Photoproducts in DNA. -
Proc. Nat. Acad. Sci., 57, 465 - 472. -

WITKIN, E.M. (1969) : Ultraviolet Induced Mutations and DNA - Repair. -
Annual Review Genetics, 3, 525 - 552. -

ZUBROFF, J.; SARMA, S.R. (1976) : A Nonradioactive Method for Measuring DNA Damage and its Repair in Nonproliferating Tissues. -
Analytical Biochemistry, 70, 387 - 396. -

Abb.: 2 Autoradiogramm des Makronukleus ohne Bestrahlung

Abb.: 3 Autoradiogramm des Makronukleus nach 6,5 kergs/mm^2.

Abb.: 4 Autoradiogramm des Makronukleus links: nach 16,2 kergs/mm^2. Rechts: nach 0.8 x 10^6 R. = Abb

Abb.: 5 Autoradiogramm des Makronukleus nach 35,6 kergs/mm^2.

Abb.: 19 Autoradiogramm des Makronukleus unbestrahlt

Abb.: 20 Autoradiogramm des Makronukleus (G_1 - Phase) nach 0.8 x 10^6 R.

Abb.: 21 Autoradiogramm des Makronukleus (S - Phase) nach 0.8 x 10^6 R.

Abb.: 24 Elektrophorese auf 1.7% Agarose Gel:

Bande 1 + 2: Makronuklei bestrahlt, 5 x 10^5 R

Bande 3 + 4: Makronuklei unbestrahlt

Bande 5 + 6: Mikronuklei bestrahlt 5 x 10^5 R

Bande 7 + 8: Mikronuklei unbestrahlt

Abb.: 25 Elektrophorese auf 1,7% Agarose Gel:

Bande 1 : Makronukleus DNA unbestrahlter Tiere

Bande 2 : Makronukleus DNA sofort nach Bestrahlung lysierter Tiere 80 000 R

Bande 3 : Makronukleus DNA 24 h nach Bestrahlung lysierter Tiere 80 000 R

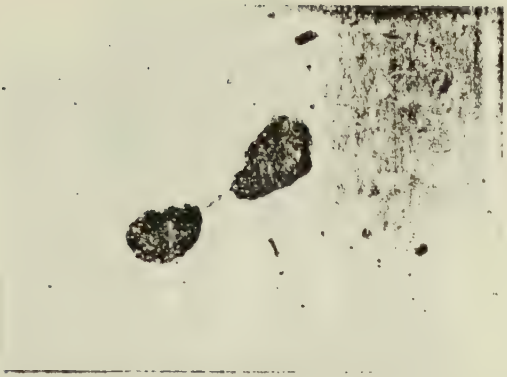


Abb.: 2

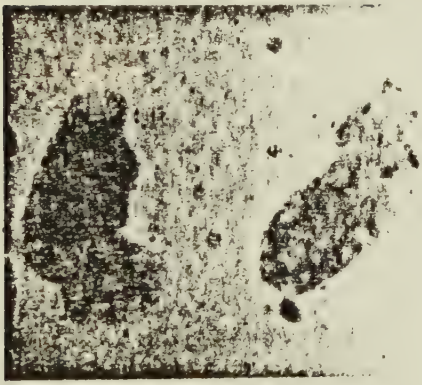


Abb.: 3

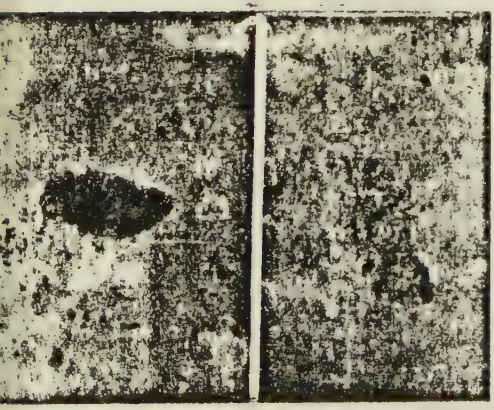


Abb.: 4

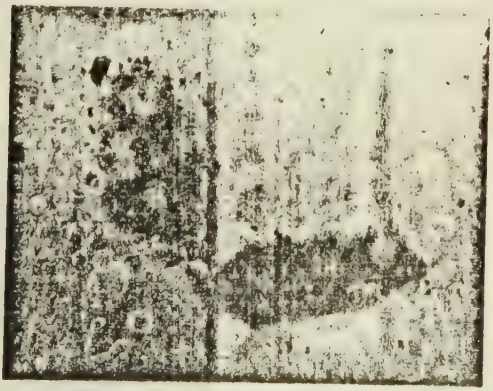


Abb.: 5

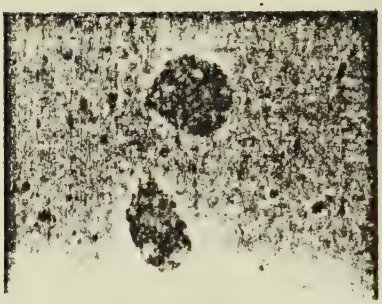


Abb.: 19

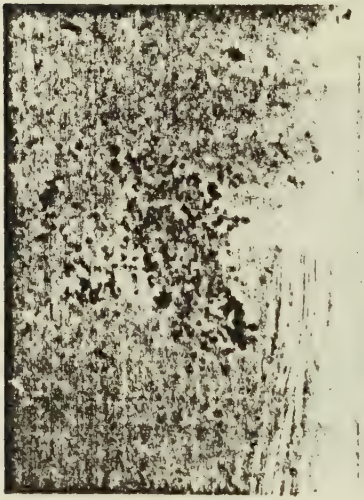


Abb.: 20

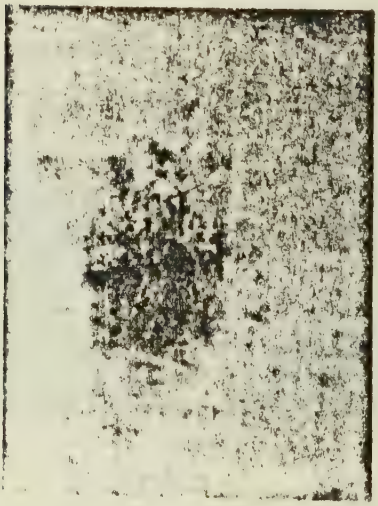


Abb.: 21

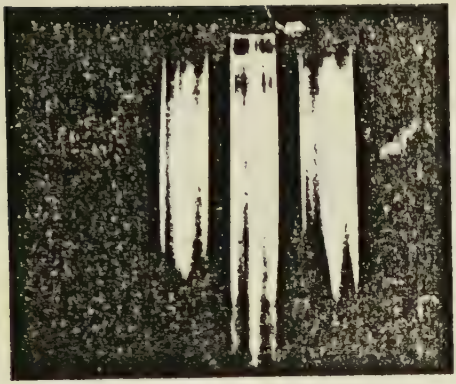


Abb.: 25

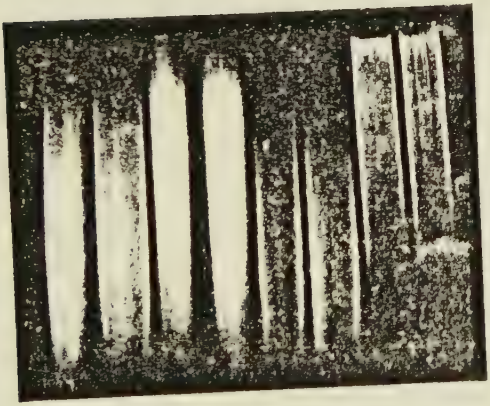


Abb.: 24

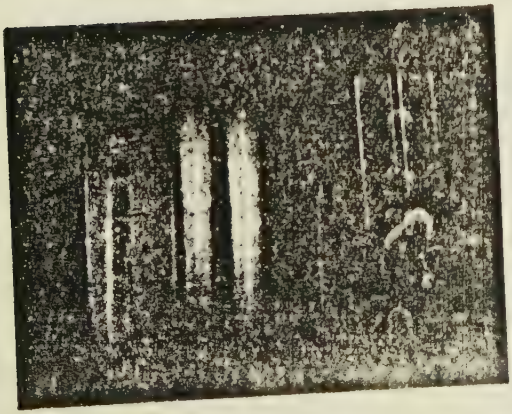


Abb.: 24

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten :

D. Ammermann, A. Barth, H. Blume, E. Bünning, W. Engels, K.G. Grell, H. Grees, V. Hemleben, W. Hennig, W. Jens, A. Karger, H. Krüger, J. Kullmann, K. Mägdefrau, G. Mickoleit, F.P. Möhres, E. Müller, W. Rüdorff, V. Schwarz, G. Schweizer, W. Seyffert, G. Weitzel, F. Westphal, H. Zähner.

Lebenslauf

28.11.49	Geboren in Cottbus
1956-1960	Besuch der Matthäus Beger Volksschule in Reutlingen
1960-1968	Besuch des Johannes Kepler Gymnasiums
Mai 1968	Abitur
1968-1974	Studium der Biologie und Geographie an der Universität Tübingen
Sept. 1973	Mündliche Prüfung für das Lehramt an höheren Schulen in Biologie (1. Hauptfach)
1974	Staatsexamensarbeit bei Prof. Ammermann an der Abteilung für Zellforschung. Thema: "Der Einfluß der Röntgen- und UV - Strahlen auf die DNA - Synthese von Stylonychia mytilus."
Mai 1974	Mündliche Prüfung für das Lehramt an höheren Schulen in Geographie (2. Hauptfach)
1974-1978	Doktorand am Institut für Biologie III, Abt. Zellforschung, der Universität Tübingen bei Herrn Prof. Dr. D. Ammermann, Thema der Arbeit: "Wirkung und Reparatur von UV- und Röntgenstrahlen bei Stylonychia mytilus (Ciliata)".
seit 1977	Wiss. Angestellter am Lehrstuhl für Entwicklungsphysiologie.
Mai 1978	Diplomprüfung in Biologie.